



| | | |
|---|-----------|---|
| (51) 国際特許分類7 C12Q 1/68, C12N 15/11 | A1 | (11) 国際公開番号 WO00/31295 (43) 国際公開日 2000年6月2日(02.06.00) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP99/05527 (22) 国際出願日 1999年10月7日(07.10.99) (30) 優先権データ 特願平10/335151 1998年11月26日(26.11.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 塩野義製薬株式会社(SHIONOGI & CO., LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 森部豊輝(MORIBE, Toyoki)(JP/JP) 〒569-1127 大阪府高槻市西真上1-2-13-402 Osaka, (JP) 兼重俊彦(KANESHIIGE, Toshihiko)(JP/JP) 〒567-0876 大阪府茨木市天王2-5-J-1105 Osaka, (JP) (74) 代理人 山内秀晃, 外(YAMAUCHI, Hideaki et al.) 〒553-0002 大阪府大阪市福島区鷺洲5丁目12番4号 塩野義製薬株式会社 特許部 Osaka, (JP) | | (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書 補正書 不利にならない開示又は発明の新規性の喪失の例外に関する陳述。 |
| (54) Title: METHOD FOR DISTINGUISHING HLA CLASS I ALLELE TYPE (54) 発明の名称 HLAクラス I 対立遺伝子型の判別方法 (57) Abstract A method for distinguishing an HLA class I allele type and a kit and a reagent therefor. More particularly, an antigen or an allele of the HLA class I is distinguished by a combination of PCR amplification with the use of a primer pair whereby all HLA-A alleles, all HLA-B alleles or all HLA-C alleles can be amplified or another primer pair specific to a base sequence common to genes of a specific group consisting of specific HLA-A alleles or specific HLA-B alleles with reverse hybridization analysis with the use of a DNA probe in the form of a solid phase covalently bonded to microtiter plate wells which are hybridizable specifically with the base sequence of at least one specific HLA-A allele, at least one specific HLA-B allele or at least one specific HLA-C allele. | | |

本発明は、H L Aクラス I 対立遺伝子型の判別方法、そのキットおよび試薬を提供する。具体的には、全てのH L A-A対立遺伝子、全てのH L A-B対立遺伝子または全てのH L A-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対、あるいは特定のH L A-A対立遺伝子群または特定のH L A-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対によるP C R増幅と、少なくとも1つの特定のH L A-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のH L A-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のH L A-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能な、マイクロタイタープレートのウェルに共有結合的に固相化したD N Aプローブによるリバーシブルハイブリダイゼーション解析との組合わせにより、H L Aクラス I の1種類の抗原あるいは対立遺伝子を判別する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | |
|-----------------|------------|----------------------|---------------|
| AE アラブ首長国連邦 | DM ドミニカ | KZ カザフスタン | RU ロシア |
| AL アルバニア | EE エストニア | LC セントルシア | SD スーダン |
| AM アルメニア | ES スペイン | LI リヒテンシュタイン | SE スウェーデン |
| AT オーストリア | FI フィンランド | LK スリ・ランカ | SG シンガポール |
| AU オーストラリア | FR フランス | LR リベリア | SI スロヴェニア |
| AZ アゼルバイジャン | GA ガボン | LS レソト | SK スロヴァキア |
| BA ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB 英国 | LT リトアニア | SL シエラ・レオネ |
| BB バルバドス | GD グレナダ | LU ルクセンブルグ | SN セネガル |
| BE ベルギー | GE グルジア | LV ラトヴィア | SZ スワジランド |
| BF ブルギナ・ファソ | GH ガーナ | MA モロッコ | TD チャード |
| BG ブルガリア | GM ガンビア | MC モナコ | TG トーゴ |
| BJ ベナン | GN ギニア | MD モルドヴァ | TJ タジキスタン |
| BR ブラジル | GW ギニア・ビサウ | MG マダガスカル | TZ タンザニア |
| BY ベラルーシ | GR ギリシャ | MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TM トルクメニスタン |
| CA カナダ | HR クロアチア | ML マリ | TR トルコ |
| CF 中央アフリカ | HU ハンガリー | MN モンゴル | TT トリニダード・トバゴ |
| CG コンゴ | ID インドネシア | MR モリタニア | UA ウクライナ |
| CH スイス | IE アイルランド | MW マラウイ | UG ウガンダ |
| CI コートジボアール | IL イスラエル | MX メキシコ | US 米国 |
| CM カメルーン | IN インド | NE ニジェール | UZ ウズベキスタン |
| CN 中国 | IS アイスランド | NL オランダ | VN ヴェトナム |
| CR コスタ・リカ | IT イタリア | NO ノルウェー | YC ユーゴスラビア |
| CU キューバ | JP 日本 | NZ ニュージーランド | ZA 南アフリカ共和国 |
| CY キプロス | KE ケニア | PL ポーランド | ZW ジンバブエ |
| CZ チェッコ | KG キルギスタン | PT ポルトガル | |
| DE ドイツ | KP 北朝鮮 | RO ルーマニア | |
| DK デンマーク | KR 韓国 | | |

明細書

H L A クラス I 対立遺伝子型の判別方法

5 技術分野

ヒトの主要組織適合性抗原である H L A (Human Leukocyte Antigen) は、免疫担当細胞の膜表面に発現し、抗原処理 (antigen processing) された外因性および内因性抗原由来のペプチドを T リンパ球に提示すると共に、自己・非自己の識別マーカーとして機能している。本発明は、H L A クラス I 対立遺伝子型の判別方法、その試薬およびキットに関するものであり、特に臨床医学領域の臓器移植の際のドナー・レシピエント間の適合性の判定や各種疾病との相関性解析などにおいて有用である。また、H L A クラス I 対立遺伝子の検出および型判別の機械化が容易に可能である。

15 背景技術

H L A 抗原は、従来より、主にヒト同種抗体を用いた血清学的方法により、型判別が行われてきた。すなわち臍帯血や頻回輸血者の血清中に含まれる各 H L A 抗原型に対する特異抗体を用いて抗原抗体反応を行い、補体依存性の細胞障害を惹起させることで、陽性細胞は細胞膜の透過性に変化を来しエオジン色素などの取り込みにより、顕微鏡下で着色され膨化した形態として識別できる。この方法により、H L A クラス I 抗原である H L A - A、B、C 抗原および同クラス II 抗原である D R、D Q 抗原の型を識別することが可能であるが、これらの方法は特異抗体の採取と品質維持、および供給面に問題があった。また方法論的には細胞の生存を指標として判定するため、被検試料の状態の悪化、例えば疾病や採血後の経時的影響に起因する細胞生存率の低下などが検査成績の信頼性の低下の誘因になるという問題があった。

近年分子生物学的技術の発展により、H L A 抗原をコードする遺伝子領域の解析に伴い各種のH L A 抗原型と遺伝子の塩基配列の対応性について知られるようになった。すなわちH L A 遺伝子の特定の遺伝子配列を調べることで、被検試料のH L A 抗原型を決定する（遺伝子タイピング）ことが可能となった。特に微細な塩基配列の変化を高感度に検出可能な技術であるP C R（Polymerase Chain Reaction）法はH L A クラスI I 抗原遺伝子であるD R、D Q、D P 遺伝子のタイピングに利用されている。これらのP C R 法を基盤としたH L A クラスI I 遺伝子タイピングの技法として、P C R - S S O P（Sequence-Specific Oligonucleotide Probe）法、P C R - R F L P（Restriction Fragment Length Polymorphism）法、P C R - S S P（Sequence-Specific Primer）法、P C R - S S C P（Single Strand Conformation Polymorphism）法などが開発されている。これらの技法は何れも解析の対象となる遺伝子領域をP C R 法で増幅し、その増幅産物を必要に応じてさらに別の技法を用いることにより、塩基配列の可変部位を解析して、遺伝子型を判別するものである。このH L A クラスI I 遺伝子タイピングでは、従来のヒト同種血清を用いた血清学的方法による型分類に留まらず、遺伝子レベルの型分類を可能にしている。すなわち、従来の血清学的方法では同一と考えられていた抗原が、遺伝子配列の違いによりさらに細分化され、本検査の臨床的意義の拡大をもたらしている。

H L A クラスI I 遺伝子タイピングに比べ、P C R 法を利用したクラスI 遺伝子タイピングの実用化は著しく遅れている。これは、（1）クラスI I 遺伝子では、抗原特異性を反映したものを含め遺伝子変異（遺伝子置換）の多くが第2エクソン（e x o n）に集中しているのに対し、クラスI 遺伝子では第2～3エクソン、また一部は第4エクソンに散在している、（2）非古典的遺伝子（H L A - E、F、G）および疑偽遺伝子（H L A - H、J、K、L）を含めH L A クラスI 遺伝子間の相同性が高い、などの理由である。

これまでに、いくつかのH L A クラスI 遺伝子タイピング法が報告されている

が何れも、操作の煩雑さ、反応条件の厳密さ、検体処理数の制限、精度の低さ、および各遺伝子に対するタイピング法の非統一性などの問題があり、さらに操作の熟練性も必要としている。

5 発明の開示

本発明の目的は、従来の血清学的方法によるHLAクラスIローカス抗原タイピングの測定上の問題を解決し、従来法では識別分類が不可能であったHLAクラスI抗原のサブタイプを遺伝子レベルで分類（alleleタイピング）可能にする方法およびそれに用いるキットや試薬を提供することである。さらに本発明の目的は、自動機械化が容易なHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法を提供することにある。

本発明者らは上記の課題に鑑み、鋭意研究した結果、全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー、および特定のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマーを創意工夫して設定することができた。また、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なDNAプローブを創意工夫して設定することができた。そして、特定のHLAクラスI対立遺伝子由来または特定のグループ由来のPCR増幅産物をマイクロタイタープレートのウェルに固相化した前記DNAプローブにハイブリダイズさせると同時またはハイブリダイズさせた後に該増幅産物の標識と特異的に結合する酵素コンジュゲートを加え、さらに該酵素に特異的に反応する発色基質、発光基質または蛍光基質を加えて、該増幅産物が固相化したDNAプローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出することによりHLAクラスIの1種類の抗原あるいは対立遺伝子を判別すること

が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は以下の(a)～(d)の工程を含むHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法を主旨としたものである。

(a) HLAクラスI抗原遺伝子またはその断片を含む核酸を鋳型として、

5 (1) 全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対を用いてPCR法を行い、全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を非選択的に増幅する工程、または

(2) 特定のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対を用いてPCR法を行い、各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する工程；

(b) 前記PCR法により得られた増幅産物を、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブをカルボキシル基修飾されたウェルに共有結合的に固相化したマイクロタイタープレートの該ウェルに加え、該増幅産物と固相化したDNAプローブとをハイブリダイズさせる工程（ここで該DNAプローブは前記増幅された特定のHLAクラスI抗原遺伝子または特定のグループに応じて選択されている）；

(c) 前記増幅産物が固相化したDNAプローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出する工程；

(d) 工程(c)で検出されたシグナルのパターンから、判定表に従ってHLAクラスI対立遺伝子型を判別する工程。

25 ここで上記工程(a)における目的遺伝子のPCR増幅は2つに分類することができる。1つは全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子ま

たは全てのH L A - C 対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対を用いて
P C R 法を行い、全てのH L A - A 対立遺伝子、全てのH L A - B 対立遺伝子ま
たは全てのH L A - C 対立遺伝子を非選択的に増幅する工程であり、また他の1
つは特定のH L A - A 対立遺伝子群または特定のH L A - B 対立遺伝子群からな
る特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対を用い
てP C R 法を行い、各特定のグループ内のH L A - A 対立遺伝子群または特定の
H L A - B 対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する工程である。前者の
工程では、P C R プライマーはH L A - A 対立遺伝子、H L A - B 対立遺伝子ま
たはH L A - C 対立遺伝子のいずれかに属する全ての各遺伝子の領域内またはそ
れを包含する前後の部分に共通な塩基配列に特異的であるよう設定する。後者の
工程では、P C R プライマーは特定のグループを増幅するために、該特定のグル
ープに含まれる全ての各遺伝子に共通な塩基配列に特異的であるように設定する。
複数のグループの存在下である特定のグループを選択的に増幅する場合、該特定
のグループに対応するプライマー対としてセンス（Sense）、アンチセンス
（Antisense）の両方に必ずしも前記で設定するプライマーを用いる必要
はなく、一方に該特定のグループに特異的なプライマーを用い、もう一方に全
てのグループに特異的なプライマーを用いてもよい。なお後者の工程については
本発明者ら自身の文献（Tissue Antigens 1997, Vol.50, 535-545）を参照すれば
よい。本明細書ではH L A - A 2 抗原またはH L A - B 4 0 抗原をコードする遺
伝子群をグループとして選択的に増幅する方法が開示される。

工程（a）ではH L A - A、B またはC のいずれかに属する対立遺伝子由来ま
たは特定のグループ由来のP C R 増幅産物が産生されるのみであり、この段階で
は個々のH L A クラス I 対立遺伝子の型までは判別できない。従って、工程（b）
における特異的D N A プローブによるハイブリダイゼーション反応を以後適用す
る。

上記工程（d）における判定表は、あらかじめH L A クラス I 抗原あるいは対

立遺伝子型が既知である試料のPCR増幅産物を少なくとも1つの特定のHLAクラスI対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なDNAプローブにハイブリダイズさせ、得られたシグナルをパターン化して作成する。

当業者ならば、このような判定表は容易に作成できる。ここに、判定表としては

- 5 例えば図1～図6を参考にすればよい。本明細書にて使用しているDNAプローブ以外のDNAプローブを使用する場合には別の判定表を使用すればよい。該別の判定表は、HLAクラスI抗原あるいは対立遺伝子型が既知の試料のPCR増幅産物を新たなDNAプローブにハイブリダイズさせ、得られたシグナルから作成すればよい。前記同様当業者ならば、このような判定表は容易に作成できる。

- 10 なお判定表に従ってHLAクラスI対立遺伝子型を判別する際には、各被検試料がHLAクラスI対立遺伝子の特定の型をホモ接合体またはヘテロ接合体で保有することに留意しなければならない。

- 好ましい実施態様としては、上記工程(c)においてPCR増幅産物が固相化したDNAプローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出する
15 ために、プライマー対の少なくとも一方が標識されたプライマーを用いて工程(a)におけるPCR法を行う。また別の態様として、4種類のデオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTP)の内の少なくとも1種類が標識されたdNTPsを用いて上記PCR法を行ってもよい。なお標識物質としては放射性、または非放射性、例えばビオチン、ジゴキシゲニンなどの物質が挙げられる。

- 20 好ましい実施態様としては、上記工程(b)または(c)においてPCR法により得られた増幅産物を固相化したDNAプローブにハイブリダイズさせると同時にまたはハイブリダイズさせた後に該増幅産物の標識と特異的に結合する酵素コンジュゲートを加え、さらに工程(c)において該酵素に特異的に反応する発色基質、発光基質または蛍光基質を加えて該増幅産物が固相化したDNAプローブ
25 にハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出する。例えば酵素コンジュゲートとしてストレプトアビジンコンジュゲートペルオキシターゼを用いる場

合、該酵素コンジュゲートをハイブリダイゼーションと同時に添加しておき、洗浄後、直ちにシグナルを検出することができる。

好ましい実施態様としては、上記工程（a）におけるプライマー対の少なくとも一方がビオチンで標識されたプライマーであり、さらに該ビオチン標識と特異的に結合する工程（b）または（c）における酵素コンジュゲートがストレプトアビジン酵素コンジュゲート、例えばストレプトアビジンコンジュゲートペルオキシダーゼまたはストレプトアビジンコンジュゲートアルカリフォスファターゼである。

好ましい実施態様としては、上記工程（b）において、PCR法により得られた増幅産物と固相化したDNAプローブとのハイブリダイゼーション反応がホルムアミドを含む溶液中である。前記溶液（ハイブリダイゼーション緩衝液）のホルムアミドの濃度は5～30%の範囲であるが、10～25%程度が好ましく、用いるDNAプローブの塩基配列、塩基数および種類などに応じて変えることができる。なお前記ホルムアミド濃度は20%前後が最も好ましい。

好ましい実施態様としては、上記工程（b）において、ハイブリダイゼーション反応がホルムアミドを含む溶液中である場合、その温度条件は37℃前後である。前記温度条件は32～42℃程度が好ましく、上記ホルムアミド濃度同様、用いるDNAプローブの塩基配列、塩基数および種類などに応じて変えることができる。なお前記温度条件は37℃程度が最も好ましい。ハイブリダイゼーション反応は通常、その特異性を高めるために65℃程度の比較的高温で行うが、ホルムアミドを含む溶液を用いることにより、37℃前後の低温で該反応を行うことが可能である。

好ましい実施態様としては、上記工程（b）のハイブリダイゼーション反応にホルムアミドを含む溶液を用いる場合、工程（b）または（c）において、PCR法により得られた増幅産物を固相化したDNAプローブにハイブリダイズさせた後の洗浄および／または該増幅産物の標識と酵素コンジュゲートとの結合反応

後の洗浄の温度条件が室温である。すなわち上記ハイブリダイゼーション反応同様、ホルムアミドを含む溶液を用いることにより、室温という低温で洗浄を行うことが可能である。

本発明の工程 (b) における、少なくとも 1 つの特定の H L A - A 対立遺伝子
5 に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾された D N A プローブ
としては、A98T (配列番号 1)、A98A (配列番号 2)、A160A (配列番号 3)、A239A
(配列番号 4)、A238A (配列番号 5)、A240T (配列番号 6)、A257TC (配列番
号 7)、A259AC (配列番号 8)、A270T (配列番号 9)、A282C (配列番号 10)、
A290T (配列番号 11)、A299T (配列番号 12)、A302G (配列番号 13)、A355G
10 (配列番号 14)、A362TA (配列番号 15)、A362TT (配列番号 16)、A368A
(配列番号 17)、A368G (配列番号 18)、A368T (配列番号 19)、A402G (配
列番号 20)、A423T (配列番号 21)、A448C (配列番号 22)、A485A (配列番
号 23)、A524G (配列番号 24)、A526T (配列番号 25)、A527A (配列番号 2
6)、A538CG (配列番号 27)、A539A (配列番号 28)、A539T (配列番号 29)、
15 A555T (配列番号 30)、A559G (配列番号 31)、A570CG (配列番号 32)、A570GT
(配列番号 33)、A779A (配列番号 34)、A843A (配列番号 35)、A34 (配列
番号 100)、A282CT (配列番号 101)、A290TR (配列番号 102)、A302GR
(配列番号 103)、A414A (配列番号 104)、A468T (配列番号 105)、A489A
(配列番号 106)、A502C (配列番号 107)、A538TG (配列番号 108) およ
20 びそれらの相補鎖から選ぶことができる。また、少なくとも 1 つの特定の H L A
- B 対立遺伝子に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾された
D N A プローブとしては、BL1 (配列番号 36)、BL3 (配列番号 37)、BL4 (配
列番号 38)、BL5 (配列番号 39)、BL9 (配列番号 40)、BL10 (配列番号 4
1)、BL11 (配列番号 42)、BL24 (配列番号 43)、BL25 (配列番号 44)、
25 BL34 (配列番号 45)、BL35 (配列番号 46)、BL36 (配列番号 47)、BL37 (配
列番号 48)、BL38 (配列番号 49)、BL39 (配列番号 50)、BL40 (配列番号

5 1)、BL41(配列番号52)、BL42(配列番号53)、BL56(配列番号54)、
BL57(配列番号55)、BL78(配列番号56)、BL79(配列番号57)、BL222A
(配列番号58)、BL272GA(配列番号59)、BL226G(配列番号60)、BL292G
(配列番号61)、BL292T(配列番号62)、BL361G(配列番号63)、BL409T
5 (配列番号64)、BL512T(配列番号65)、BL538CG(配列番号66)、BL538G
(配列番号67)、BL39R(配列番号109)、BL50(配列番号110)、BL77
(配列番号111)、BL272A(配列番号112)、BL263T(配列番号113)、
BL527A(配列番号114)、BL570GT(配列番号115)およびそれらの相補鎖か
ら選ぶことができる。また、少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩
10 基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAブ
ローブとしては、CC(配列番号68)、A-1(配列番号69)、A-2(配列番号7
0)、A-3(配列番号71)、A-4(配列番号72)、A-52(配列番号73)、B-
1(配列番号74)、B-2(配列番号75)、C-1(配列番号76)、C-22(配列番
号77)、C-3(配列番号78)、C-42(配列番号79)、134-g(配列番号80)、
15 134-A2(配列番号81)、353TCA(配列番号82)、343A(配列番号83)、RA-2
(配列番号116)、RA-41(配列番号117)、RB-28(配列番号118)、201g1
(配列番号119)、C206gR(配列番号120)、R341A(配列番号121)、R343g3
(配列番号122)、353TCC(配列番号123)、361T1(配列番号124)、361T368g
(配列番号125)、361T368T1(配列番号126)、369C(配列番号127)、
20 387g1(配列番号128)、526AC2(配列番号129)、538gAC(配列番号130)
およびそれらの相補鎖から選ぶことができる。なお本発明は、上記HLAクラス
I対立遺伝子型の判別方法に使用するための少なくとも1つの特定のHLA-A
対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1
つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすること
25 が可能なDNAプローブ(配列番号1～配列番号83および配列番号100～配
列番号130)自身も含むものである。前記DNAプローブはアミノ基修飾され

ていてもアミノ基修飾されていなくてもよいが、マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに共有結合的に固相化する場合にはアミノ基修飾されたDNAプローブを用いる。当業者ならば容易に理解できるように、前記DNAプローブは、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1
5 つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能な範囲、すなわち該DNAプローブが本来有するハイブリダイゼーションの特異性を維持する範囲で、その末端配列に対し数塩基の欠失または付加を行うことができる。従って本発明のDNAプローブは、配列番号1～配列番号83および配列番号100～配列番号130の核酸配列に対し前記範囲で塩基の欠失または付加をしたDNAプローブも含むものである。
10

本発明の工程(a)における、全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマーとしては、CGA011(配列番号90)、CGA012(配列番号91)、AIn3-66C(配
15 列番号92)、5BCIn37-34C(配列番号96)、5BCIn37-24g(配列番号97)および5BCIn37-34g2(配列番号99)から選ぶことができる。また特定のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマーとしては、A2-5T(配列番号84)、A3-273T(配列番号85)、A4-8C(配列番号86)、A4-254G(配列番号8
20 7)、BASF-1(配列番号88)およびBASR-1(配列番号89)から選ぶことができる。なお本発明は、上記HLAクラスI対立遺伝子判別法に使用するためのプライマー(配列番号88～配列番号92、配列番号96～配列番号97および配列番号99)自身も含むものである。

HLA-A対立遺伝子、HLA-B対立遺伝子およびHLA-C対立遺伝子は
25 新規なものが次々と発見され、WHO(世界保健機構)のHLA命名委員会の報告書では1997年3月時点でそれぞれ、82種類、186種類、42種類の対

立遺伝子の存在が知られている。本発明はこれらの全ての対立遺伝子を識別することが可能であるが、今後さらに発見・登録される対立遺伝子の識別についても本発明で示した方法、上記以外のDNAプローブまたはプライマーの追加などの容易な改変により対応することが可能である。

- 5 また本発明は、本明細書記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法に使用するためのキット、試薬も提供することが可能である。さらに本発明は、本明細書記載のDNAプローブまたはプライマーを含むキット、試薬も提供することが可能である。該キットは、例えば本発明で開示されているプライマー（配列番号84～配列番号92、配列番号96～配列番号97および配列番号99）を含む
- 10 溶液、PCR緩衝液（濃縮溶液でもよい）、dNTPs、耐熱性DNAポリメラーゼ、本発明で開示されているDNAプローブ（配列番号1～配列番号83および配列番号100～配列番号130）または該DNAプローブをウェルに共有結合的に固相化したマイクロタイタープレート、変性液、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄液および該キットの説明書（上記判定表を含む）により構成される。前記プ
- 15 ライマーは放射性または非放射性の物質により標識されていても標識されていなくてもよく、プライマー対の形で構成されていてもよい。また該プライマーを含む溶液は凍結乾燥状態でもよい。なお前記プライマーが非標識の場合、4種類のdNTPの内の少なくとも1種類が標識されたdNTPsを用いる。標識に非放射性の物質を適用する場合、必要に応じて本発明で開示されている酵素コンシュゲート溶
- 20 液、発色試薬（発色基質、発色液を含む）、発光試薬または蛍光試薬、停止液などを構成に加えてもよい。さらにゲノムDNAを単離するためのグアニジンチオシアネートバッファーなど、キットの構成は本発明の実施を促進する程度で任意に追加することかできる。

25 図面の簡単な説明

図1は、HLA-A2対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプロー

ブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-A2対立遺伝子型を図左部に示す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

図2は、HLA-B40対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプローブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-B40対立遺伝子型を図左部に示す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

図3は、HLA-A抗原および対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプローブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-A抗原および対立遺伝子型を図左部に示す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

図4および図5は、HLA-B抗原および対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプローブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-B抗原および対立遺伝子型を図左部に示す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

図6は、HLA-C抗原および／または対立遺伝子型が既知である試料と本発明のDNAプローブとの反応パターンを記載した判定表を示す図である。各DNAプローブ名を図上部に示し、各HLA-C抗原および／または対立遺伝子型を図左部に示す。Closed squareは陽性反応を表わし、Opened squareは陰性反応を表わす。

発明を実施するための最良の形態

次に、上記本発明の手順をさらに詳細に説明する。

本発明の判別方法は、以下の6段階に分けて説明することができる。すなわち、
1) 染色体(ゲノム)DNAの抽出、2) 目的遺伝子のPCR増幅、3) マイクロタイタープレートのウェルへのDNAプローブの固相化、4) PCR増幅産物

とDNAフローのハイブリダイゼーション、5) シグナルの検出、6) 遺伝子型の判定、である。

1) 染色体 (ゲノム) DNAの抽出

以下にゲノムDNAの調製方法の一例を説明する。採取した血液より常法に従い白血球を分離し、これにグアニジンチオシアネートバッファーなどを加えて溶解させた後、フェノール抽出によりタンパク質を除去する。これに酢酸ナトリウム (pH 5.2) を添加し攪拌後、冷エタノールを添加してゲノムDNAを得る。

2) 目的遺伝子のPCR増幅

上記DNAを鋳型として、HLAクラスI対立遺伝子を含む領域をPCR法により増幅する。前記増幅反応に用いる試薬は市販のものを使用することができ、添付の説明書の指示に従って行えばよいが、必要に応じ反応温度、時間、サイクル数などの条件を変えてもよい。このとき1反応チューブに1プライマー対を用いて増幅を行うが、該反応チューブに複数のプライマー対を入れて増幅させ、操作タスクや経費の削減を実現することができる。また本発明の目的から、実際の検査やキットでは、一方のプライマーがビオチンで標識されたプライマー対が用いられる。

例えばHLA-A2対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅には、A2-5Tと5'末端をビオチンで標識したA3-273Tとをプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。またHLA-A対立遺伝子の第4エクソンを含む領域の増幅には、A4-8Cと5'末端をビオチン標識したA4-254Gとをプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。なお前記プライマーについては本発明者ら自身の文献 (Tissue Antigens 1997、前出) を参照のこと。

例えばHLA-B40対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅には、BASF-1と5'末端をビオチンで標識したBASR-1とをプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。

例えば全てのHLA-A対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第

3 エクソンを含む領域の増幅には、CGA011 または CGA012 と 5'末端をビオチンで標識した AIn3-66C とをプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。

例えば全てのHLA-B対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅には、5BIN1-TA(配列番号93)または5BIN1-CG(配列番号94)と5'末端をビオチンで標識した3BIN3-37(配列番号95)とをプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。なお前記プライマーについてはCereb N.らの文献(Tissue Antigens 1997, Vol.50, 74-76)を参照のこと。

例えば全てのHLA-C対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅には、5BCIn37-34C、5BCIn37-24gまたは5BCIn37-34g2と5'末端をビオチンで標識した3BCIn3-12(配列番号98)とをプライマー対として用い、PCR法を行えばよい。なお前記プライマー3BCIn3-12についてはCereb N.らの文献(Tissue Antigens 1995, Vol.45, 1-11)を参照のこと。

3) マイクロタイタープレートのウェルへのDNAプローブの固相化

少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-A-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブ(1~20 pmol)をポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾された各ウェルに添加し、適当な触媒、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)などを用いて化学的にアミド結合反応を誘導し、両者を共有結合的に固相化する。該DNAプローブをウェルに固相化した後のマイクロタイタープレートは適当な緩衝液で洗浄する。なお洗浄後のマイクロタイタープレートは、湿潤冷蔵条件で長期保存が可能である。

4) PCR増幅産物とDNAプローブのハイブリダイゼーション

上記PCR増幅産物は、例えばNaOHなどの強アルカリ存在下で変性して1本鎖DNAとした後、マイクロタイタープレートのウェルに固相化されたDNAプローブにハイブリダイズさせる。前記ハイブリダイズは、20%前後のホルムアミ

ドを含む溶液中、37℃前後のハイブリダイゼーション条件で行う。そしてハイブリダイゼーション反応終了後、洗浄を行うことにより、過剰あるいは前記DNAプローブと特異的な塩基配列を持たない増幅産物を除去する。なおここで用いるDNAプローブは、上記で増幅された特定のHLAクラスI抗原遺伝子または

5 特定のグループに応じて選択される。

例えば上記A2-5TとA3-273Tとのプライマー対によるHLA-A2対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅産物、あるいはA4-8CとA4-254Gとのプライマー対によるHLA-A対立遺伝子の第4エクソンを含む領域の増幅産物には、A98T、A98A、A160A、A240T、A270T、A290T、

10 A355G、A362TA、A362TT、A368A、A368G、A368T、A402G、A485A、A527A、A539A、A539T、A559G、A570CG、A779A、A843AをDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい。

例えば上記BASF-1とBASR-1とのプライマー対によるHLA-B40対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅産物に

15 は、BL4、BL5、BL24、BL25、BL34、BL35、BL37、BL39、BL41、BL50、BL56、BL57、BL222A、BL409T、BL512TをDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい。

例えば上記CGA011およびCGA012とA1n3-66Cとのプライマー対による全てのHLA-A対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む

20 領域の増幅産物には、A34、A239A、A238A、A257TC、A259AC、A282C、A282CT、A290TR、A299T、A355G、A414A、A448C、A468T、A489A、A502C、A526T、A538CG、A538TG、A539A、A539T、A555T、A570CG、A570GT、A302GRをDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい。

例えば上記5BIN1-TAおよび5BIN1-CGと3BIN3-37とのプライマー対による全てのHLA-B対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを

25 含む領域の増幅産物には、BL1、BL3、BL4、BL9、BL10、BL11、BL34、BL36、BL37、

BL38、BL39R、BL40、BL41、BL42、BL77、BL78、BL79、BL226G、BL263T、BL272A、BL527A、BL538CG、BL538G、BL570GTをDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい

例えば上記 5BCIn37-34C、5BCIn-37-24g および 5BCIn37-34g2 と 5BCIn3-12 との
5 プライマー対による全てのHLA-C対立遺伝子の第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域の増幅産物には、201g1、C206gR、A-12、RA-2、A-3、RA-41、A-54、B-1、RB-28、C-12、C-24、C-33、C-43、134-g、134-A2、353TCA1、343A、R341A、R343g3、353TCC、361T1、361T368g、361T368T1、369C、387g1、526AC2、538gACをDNAプローブとして用い、ハイブリダイゼーション反応を行えばよい。

10 なおこれらDNAプローブとのハイブリダイズの可否により判別される具体的なHLAクラスI対立遺伝子型については実施例および図面を参照すればよい。
またこれらDNAプローブ以外にも、A302G、A423T、A524G、BL272GA、BL292G、BL292T、BL361G、CC、A-2、A-4およびB-2を以下に示すHLAクラスI抗原または対立遺伝子型の判別に用いることが可能である。すなわち、A302GはA*2501お
15 よびA*3201の、A423TはA*2501、A26、A34、A*4301およびA66の、A524GはA*2301、A29、A*31012、A*3201、A33およびA*7401の、HLA-A抗原または対立遺伝子型の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能である。また、BL272GAはB14、B38およびB39の、BL292GはB7、B8、B14、B27、B39、B*4201、B*4601、B*5401、B55、B56、B67、B*7301、B*7801およびB*8101の、BL292TはB13、B15、
20 B18、B35、B37、B38、B40、B41、B44、B*4501、B*4701、B48、B*4901、B*5001、B51、B52、B*5301、B57、B58、B*5901およびB*7802の、BL361GはB57の、HLA-A-B抗原または対立遺伝子型の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能である。さらに、CCは全ての、A-2はCw2、Cw3、Cw*0403およびCw15の、A-4はCw*0602、Cw7およびCw18の、B-2はCw1、Cw3、Cw7、Cw8、Cw*1202、Cw*1203、
25 Cw*1301、Cw*14、Cw*1601およびCw*16041の、HLA-C抗原または対立遺伝子型の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能である。

5) シグナルの検出

以下にシグナルの検出の一例を説明する。DNAプローブとハイブリダイズしたPCR増幅産物はそれ自身が含有する標識、例えばビオチンなどを利用して検出する。すなわちビオチンに対し結合性を有するストレプトアビジンコンジュゲートアルカリフォスファターゼまたはストレプトアビジンコンジュゲートペルオキシダーゼを上記マイクロタイタープレートの各ウェルに加えてシールなどにより蓋をし、適当な温度条件で放置して反応させる。そして *p*-ニトロフェニルリン酸 (PNPP) または 3,3',5,5'-テトラメチルベンジチン (TMB) などの発色基質を用いて、ハイブリダイズした増幅遺伝子をシグナルとして検出する。シグナルの検出は吸光度測定などにより行う。なお前記シグナルは機械による自動検出も可能であるが、発色による場合は肉眼によって容易に検出できる。

6) 遺伝子型の判定

上記マイクロタイタープレートの検出されたシグナルのパターンから、例えば図1～図6に開示される判定表に従ってHLAクラスI対立遺伝子型を判別する。なお前記図1～図6の判定表は、必要に応じてそのパターンをアレンジして用いてもよい。

実施例

次に、実際の既知試料を用いた実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明の範囲はこれらのみに限定されるものではない。

実施例 1 HLA-A2 対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液 (約 10ml) より常法に従い分離した白血球 (試料 1～4) に 500 μ l のグアニジンチオシアネートバッファー (4 M グアニジンチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)、0.5% N-ラウロイルサルコシルナトリウム、1%メルカプトエタノール) を加えて溶解させた後、2 回のフェノ

ール抽出によりタンパク質を除去した。これに 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を添加し攪拌後、2 倍量の冷エタノールを添加してゲノム DNA を得た。この DNA を用いて、以下のようにして HLA-A2 対立遺伝子の型判定を行った。

上記 DNA を用い、A2-5T と 5'末端をビオチン標識した A3-273T とをプライマー対として、PCR 法により HLA-A2 対立遺伝子の第 2 エクソン、第 2 イン
5 トロンおよび第 3 エクソンを含む領域の増幅を行った。また同様に、A4-8C と 5'末端をビオチン標識した A4-254G とをプライマー対として、PCR 法により HLA-A 対立遺伝子の第 4 エクソンを含む領域の増幅を行った。反応液はゲノム DNA を 100ng、あらかじめ等量の Taq Start™ Antibody と室温で 5 分間反応させた
10 耐熱性 DNA ポリメラーゼを 1.4 unit、そして最終濃度がトリス塩酸 (pH8.8) は 67mM、硫酸アンモニウムは 16.6mM、塩化マグネシウムは 1.5mM、ツイーン 20 は 0.01%、dNTPs は 200 μ M、プライマー対は 1.7 μ M になるように添加した組成液で、全量を 80 μ l として反応を行った。DNA 増幅は GeneAmp PCR system 9600 (パーキンエルマー社製) の PCR 増幅装置を用い、変性 (95°C) を 2 分を行った
15 後、変性 25 秒、アニーリング (70°C) 45 秒、DNA 伸長 (72°C) 45 秒の反応を 5 サイクル繰り返し、さらに変性 25 秒、アニーリング (65°C) 50 秒、DNA 伸長 (72°C) 45 秒の反応を 36 サイクル繰り返すことにより行った。

5'末端をアミノ基修飾した DNA プロブ、A98T、A98A、A160A、A240T、A270T、A290T、A355G、A362TA、A362TT、A368A、A368G、A368T、A402G、A485A、A527A、
20 A539A、A539T、A559G、A570CG、A779A、A843A をポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに以下の手順で共有結合的に固相化した。先ず、滅菌蒸留水に溶解した前記 DNA プロブを 20 ウェルで 1 検体分とし、図 1 に示した順番で各ウェルに 25 μ l ずつ添加し、続いて 0.2M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) 溶液を 75 μ l ずつ添加
25 し混和した。次に、シールで蓋をして室温で 16 時間放置した後、PBS 緩衝液 (7.5mM リン酸水素 2 カリウム、2.5mM リン酸 2 水素カリウム、0.15M 塩化ナトリウム) で

4回洗浄した。洗浄後、0.4N NaOHを200 μ lずつ添加して37°Cで1時間放置した後にPBS緩衝液で4回洗浄した。

マイクロタイタープレートの各ウェルにハイブリダイゼーションバッファーであるGMCバッファー(0.25Mりん酸水素2ナトリウム、7% SDS、1% BSA、
5 0.5M EDTA、0.03Mリン酸、20%ホルムアミド)を100 μ lずつ添加して37°Cで5分間放置した後、各ウェルのバッファー液を捨てた。またその間に、第2エクソン、第2イントロンおよび第3エクソンを含む領域から得られた増幅産物を72 μ l、並びに第4エクソンを含む領域から得られた増幅産物を8 μ lそれぞれ採取し、それらに等量の0.4N NaOHを加えて混和した後、室温で5分間静置して
10 変性させた。変性後、それらにそれぞれ1800 μ lまたは200 μ lのハイブリダイゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに100 μ lずつ添加した(前者はウェル1から18、後者はウェル19と20に添加した)。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37°Cで1時間放置した。

ウェルの溶液を除去した後、2×SSC洗浄液(0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸3ナトリウム)で5回洗浄し、各ウェルにTTBS酵素希釈液(0.2Mトリス塩酸(pH7.6)、0.5M塩化ナトリウム、0.5% ツイーン20)で1000倍に希釈した
15 アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン(GIBCO BRL社製)を100 μ lずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37°Cで45分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で5回洗浄し、発
20 色基質液(4mg/ml PNPP(p-ニトロフェニルリン酸)、1mM塩化マグネシウム、10% ジエタノールアミン(pH9.8))を添加して37°Cで30分間放置した。放置終了後、各ウェルに0.5M EDTAを25 μ lずつ添加して発色反応を停止させ、405nmの吸光度を測定した。各配列の吸光度は表1に示される通りであった。陽性シグナルは1.0以上の値が、陰性シグナルは0.5未満の値が得られた。またこの結果を用い
25 て、図1に示した判定表に従って各試料(1~4)のHLA-A2対立遺伝子の型判定を行った。その結果は下記表1の最下段に示される通りであった。

【表 1】

H L A - A 2 対立遺伝子の型判定結果 (405nm 吸光度)

| ウェル | SSO フローブ | 試料 1 | 試料 2 | 試料 3 | 試料 4 |
|-----------------------|---------------|--------|--------|--------|-----------------|
| 1 | A240T | 1.894 | 1.907 | 2.049 | 1.849 |
| 2 | A368A | 1.675 | 1.744 | 0.116 | 1.210 |
| 3 | A368G | 0.265 | 0.294 | 2.050 | 0.198 |
| 4 | A368T | 0.077 | 0.212 | 0.038 | 0.065 |
| 5 | A362TT+A362TA | 0.282 | 0.261 | 0.052 | 0.202 |
| 6 | A98T | 1.655 | 0.084 | 1.768 | 1.406 |
| 7 | A98A | 0.047 | 1.871 | 0.038 | 1.589 |
| 8 | A539T | 1.952 | 1.971 | 1.974 | 1.127 |
| 9 | A539A | 0.267 | 0.280 | 0.380 | 0.232 |
| 1 0 | A402G | 0.299 | 0.344 | 0.326 | 0.227 |
| 1 1 | A527A | 0.199 | 0.212 | 0.229 | 0.140 |
| 1 2 | A270T | 0.194 | 0.265 | 0.263 | 0.229 |
| 1 3 | A290T | 0.118 | 0.104 | 0.105 | 0.112 |
| 1 4 | A559G | 0.027 | 0.019 | 0.026 | 0.048 |
| 1 5 | A485A | 0.171 | 0.176 | 0.169 | 0.108 |
| 1 6 | A355G | 1.956 | 1.971 | 1.877 | 1.344 |
| 1 7 | A160A | 0.024 | 0.024 | 0.030 | 0.030 |
| 1 8 | A570CG | 0.040 | 0.027 | 0.050 | 0.064 |
| 1 9 | A779A | 0.020 | 0.021 | 0.034 | 0.041 |
| 2 0 | A843A | 0.025 | 0.049 | 0.038 | 0.045 |
| H L A - A 2 対立遺伝子型 | | A*0201 | A*0206 | A*0207 | A*0201/ 0206 |

実施例2 H L A - B 4 0 対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液（約 10ml）より常法に従い分離した白血球（試料 5 ～ 8）に 500 μ l のグアニジンチオシアネートバッファー（4 M グアニジンチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.5% N-ラウロイルサルコシルナトリウム、1%メルカプトエタノール）を加えて溶解させた後、2 回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに 3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）を添加し攪拌後、2 倍量の冷エタノールを添加してゲノム DNA を得た。この DNA を用いて、以下のようにして H L A - B 4 0 対立遺伝子の型判定を行った。

上記 DNA を用い、BASF-1 と 5'末端をビオチン標識した BASR-1 とをプライマー対として、P C R 法により H L A - B 4 0 対立遺伝子の第 2 エクソン、第 2 インترونおよび第 3 エクソンを含む領域の増幅を行った。反応液はゲノム DNA を 100ng、あらかじめ等量の Taq StartTMAntibody と室温で 5 分間反応させた耐熱性 DNA ポリメラーゼを 1.4 unit、そして最終濃度がトリス塩酸（pH8.8）は 33.5mM、硫酸アンモニウムは 8.8mM、塩化マグネシウムは 1.5mM、ツイーン 20 は 0.005%、dNTPs は 200 μ M、プライマー対は 1.7 μ M になるように添加した組成液で、全量を 70 μ l として反応を行った。DNA 増幅は GeneAmp PCR system 9600 の P C R 増幅装置を用い、変性（95°C）を 2 分を行った後、変性 25 秒、アニーリング（70°C）45 秒、DNA 伸長（72°C）45 秒の反応を 5 サイクル繰り返し、さらに変性 25 秒、アニーリング（65°C）50 秒、DNA 伸長（72°C）45 秒の反応を 36 サイクル繰り返すことにより行った。

5'末端をアミノ基修飾した DNA プローブ、BL4、BL5、BL24、BL25、BL34、BL35、BL37、BL39、BL41、BL50、BL56、BL57、BL222A、BL409T、BL512T をポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに以下の手順で共有結合的に固相化した。まず、滅菌蒸留水に溶解した前記 DNA プローブを 15 ウェルで 1 検体分とし、図 2 に示した順番で各ウェルに 25 μ l ずつ添加し、続い

て 0.2M EDC 溶液を 75 μ l ずつ添加し混和した。次に、シールで蓋をして室温で 16 時間放置した後、PBS 緩衝液 (7.5mM リン酸水素 2 カリウム、2.5mM リン酸 2 水素カリウム、0.15M 塩化ナトリウム) で 4 回洗浄した。洗浄後、0.4N NaOH を 200 μ l ずつ添加して 37°C で 1 時間放置した後に PBS 緩衝液で 4 回洗浄した。

- 5 マイクロタイタープレートの各ウェルに GMC バッファー (0.25M リン酸水素 2 ナトリウム、7% SDS、1% BSA、0.5M EDTA、0.03M リン酸、20%ホルムアミド) を 100 μ l ずつ添加して 37°C で 5 分間放置した後、各ウェルのバッファー液を捨てた。またその間に、上記増幅産物 60 μ l と等量の 0.4N NaOH とを混和し、室温で 5 分間静置して変性させた。変性後、それに 1500 μ l のハイブリダイゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに 100 μ l ずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートにシールで蓋をして 37°C で 1 時間放置した。

- ウェルの溶液を除去した後、2 \times SSC 洗浄液 (0.3M 塩化ナトリウム、0.03M クエン酸 3 ナトリウム) で 5 回洗浄し、各ウェルに TTBS 酵素希釈液 (0.2M トリス塩酸 (pH7.6)、0.5M 塩化ナトリウム、0.5% ツイーン 20) で 2000 倍に希釈した
- 15 ベルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ベクターラボラトリーズ社製) を 100 μ l ずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして 37°C に 15 分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で 5 回洗浄し、発色基質液 (3,3',5,5'-テトラメチルベンジチン (TMB) 溶液: Kirkegaard & Perry ラボラトリーズ社製) を添加して 37°C で 30 分間放置した。放置終了後、各
- 20 ウェルに 1% SDS を 100 μ l ずつ添加して発色反応を停止させ、650nm の吸光度を測定した。各配列の吸光度は下記表 2 に示される通りであった。陽性シグナルは 1.0 以上の値が、陰性シグナルは 0.5 未満の値が得られた。またこの結果を用いて、図 2 に示した判定表に従って各試料 (5~8) の HLA-B*40 対立遺伝子の型判定を行った。その結果は下記表 2 の最下段に示される通りであった。

【表 2】

H L A - B 4 0 対立遺伝子の型判定結果 (650nm 吸光度)

| ウェル | SSO プローブ | 試料 5 | 試料 6 | 試料 7 | 試料 8 |
|-------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | BL222A | 1.846 | 1.671 | 1.742 | 1.849 |
| 2 | BL34 | 2.126 | 2.148 | 2.182 | 2.239 |
| 3 | BL35 | 0.088 | 0.082 | 0.083 | 0.093 |
| 4 | BL4 | 1.966 | 1.870 | 1.800 | 1.976 |
| 5 | BL5 | 0.154 | 0.161 | 0.142 | 0.205 |
| 6 | BL24 | 1.711 | 1.744 | 1.671 | 2.018 |
| 7 | BL25 | 0.050 | 0.051 | 0.056 | 0.067 |
| 8 | BL512T | 2.356 | 0.209 | 0.238 | 0.058 |
| 9 | BL37 | 0.130 | 2.533 | 2.517 | 0.014 |
| 1 0 | BL39 | 0.069 | 0.099 | 0.111 | 0.027 |
| 1 1 | BL41 | 0.042 | 0.064 | 0.070 | 2.315 |
| 1 2 | BL50 | 0.101 | 0.014 | 0.039 | 0.044 |
| 1 3 | BL56 | 2.487 | 2.464 | 0.373 | 2.342 |
| 1 4 | BL57 | 0.193 | 0.156 | 2.124 | 0.093 |
| 1 5 | BL409T | 0.038 | 0.050 | 0.287 | 0.031 |
| H L A - B 4 0 対立遺伝子型 | | B*4001 | B*4002 | B*4003 | B*4006 |

実施例 3 H L A - A 抗原および対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液（約 10ml）より常法に従い分離した白血球（試料 9 ~ 12）に 500 μ l のグアニジンチオシアネートバッファー（4 M グアニジンチオシアネート、25mM クエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.5% N-ラウロイルサルコシルナトリウム、1%メルカプトエタノール）を加えて溶解させた後、2 回のフェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに 3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）を添加し攪拌後、2 倍量の冷エタノールを添加してゲノム DNA を得た。この DNA を用いて、以下のようにして H L A - A 抗原および対立遺伝子の型判定を行った。

上記 DNA を用い、CGA011 および CGA012 と 5' 末端をビオチン標識した AIn3-66C とをプライマーとして、P C R 法により全ての H L A - A 対立遺伝子の第 2 エクソン、第 2 イントロンおよび第 3 エクソンを含む領域の増幅を行った。反応液はゲノム DNA を 100ng、あらかじめ等量の Taq Start™ Antibody と室温で 5 分間反応させた耐熱性 DNA ポリメラーゼを 1.4 unit、そして最終濃度がトリス塩酸（pH8.8）は 33.5mM、硫酸アンモニウムは 8.8mM、塩化マグネシウムは 1.5mM、ツイン 20 は 0.005%、dNTPs は 200 μ M、プライマー対は 1.7 μ M（但し CGA011 と CGA012 を 4 : 1 の割合で混合したものを使用した）になるように添加した組成液で、全量を 100 μ l として反応を行った。DNA 増幅は GeneAmp PCR system 9600 の P C R 増幅装置を用い、変性（95℃）を 2 分行った後、変性 25 秒、アニーリング（70℃）45 秒、DNA 伸長（72℃）45 秒の反応を 5 サイクル繰り返し、さらに変性 25 秒、アニーリング（65℃）50 秒、DNA 伸長（72℃）45 秒の反応を 36 サイクル繰り返すことにより行った。

5' 末端をアミノ基修飾した DNA フローブ、A34、A239A、A238A、A257TC、A259AC、A282C、A282CT、A290TR、A299T、A302GR、A355G、A414A、A448C、A468T、A489A、A502C、A526T、A538CG、A538TG、A539A、A539T、A555T、A570CG、A570GT をポリ

スチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに以下の手順で共有結合的に固相化した。まず、滅菌蒸留水に溶解した前記DNAプローブを23ウェルで1検体分とし、図3に示した順番で各ウェルに25 μ lずつ添加し、続いて0.2M EDC 溶液を75 μ lずつ添加し混和した。次に、シールで蓋をして室温で16時間放置した後、PBS緩衝液(7.5mMリン酸水素2カリウム、2.5mMリン酸2水素カリウム、0.15M塩化ナトリウム)で4回洗浄した。洗浄後、0.4N NaOHを200 μ lずつ添加し37°Cで1時間放置した後にPBS緩衝液で4回洗浄した。

マイクロタイタープレートの各ウェルにGMCバッファー(0.25Mりん酸水素2ナトリウム、7% SDS、1% BSA、0.5M EDTA、0.03Mリン酸、20%ホルムアミド)を100 μ lずつ添加して37°Cで5分間放置した後、各ウェルのバッファー液を捨てた。またその間に、上記増幅産物96 μ lと等量の0.4N NaOHとを混和し、室温で5分間静置して変性させた。変性後、それに2400 μ lのハイブリダイゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに100 μ lずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートにシールにより蓋をして37°Cで1時間放置した。

ウェルの溶液を除去した後、2 \times SSC洗浄液(0.3M塩化ナトリウム、0.03Mクエン酸3ナトリウム)で5回洗浄し、各ウェルにTTBS酵素希釈液(0.2Mトリス塩酸(pH7.6)、0.5M塩化ナトリウム、0.5% ツイーン20)で2000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ペーリンガーマンハイム社製)を100 μ lずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37°Cに15分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で5回洗浄し、発色基質液(TMB溶液: Kirkegaard & Perry ラボラトリーズ社製)を添加し、37°Cで30分間放置した。放置終了後、各ウェルに1% SDSを100 μ lずつ添加して発色反応を停止させ、650nmの吸光度を測定した。各配列の吸光度から陽性シグナルは1.0以上の値が、陰性シグナルは0.5未満の値が得られた。また、その結果より、図3に示した判定表に従って各試料(9~12)についてHLA-A抗原および対立遺伝子の型判定を行った。その結果は下記表3の最下段に示さ

れる通りであった。

【表 3】

H L A - A 抗原および対立遺伝子の型判定結果 (650nm 吸光度)

| ウェル | SSO プローブ | 試料 9 | 試料 1 0 | 試料 1 1 | 試料 1 2 |
|------------------------------|--------------|--------|--------|---------------|--------|
| 1 | A468T | 2.963 | 3.046 | 2.603 | 2.719 |
| 2 | A570CG | 0.087 | 2.951 | 0.081 | 2.847 |
| 3 | A570GT | 2.815 | 0.065 | 2.690 | 2.763 |
| 4 | A282C+A282CT | 1.950 | 2.825 | 2.538 | 2.552 |
| 5 | A299T | 0.111 | 0.119 | 0.279 | 0.162 |
| 6 | A290TR | 0.012 | 0.135 | 2.245 | 0.095 |
| 7 | A355G | 2.382 | 0.033 | 0.037 | 0.128 |
| 8 | A259AC | 0.048 | 0.063 | 0.095 | 2.127 |
| 9 | A257TC | 0.034 | 0.021 | 0.054 | 0.060 |
| 1 0 | A238A | -0.016 | 0.011 | 1.907 | 0.041 |
| 1 1 | A239A | 0.037 | 0.052 | 0.061 | 0.187 |
| 1 2 | A538CG | 0.012 | 0.025 | 0.017 | 0.065 |
| 1 3 | A555T | 0.068 | 0.038 | 0.066 | 0.090 |
| 1 4 | A539T | 2.480 | 0.048 | 1.618 | 0.093 |
| 1 5 | A539A | 0.111 | 2.513 | 0.205 | 2.402 |
| 1 6 | A526T | 0.023 | 0.046 | 0.105 | 0.065 |
| 1 7 | A538TG | 0.109 | 0.118 | 0.092 | 2.125 |
| 1 8 | A302GR | -0.020 | 0.169 | 0.030 | 0.237 |
| 1 9 | A34 | 2.186 | 0.121 | 1.441 | 2.271 |
| 2 0 | A414A | 0.031 | 0.127 | 0.079 | 0.095 |
| 2 1 | A448C | 0.232 | 0.091 | 0.073 | 2.412 |
| 2 2 | A489A | 2.896 | 0.100 | 0.051 | 0.276 |
| 2 3 | A502C | 0.017 | 0.135 | 1.401 | 2.517 |
| H L A - A 抗原および 対立遺伝子型 | | A2/- | A24/- | A*31012/ - | A24/26 |

実施例 4 H L A - B 抗原および対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液（約 10ml）より常法に従い分離した白血球（試料 1 3
～ 1 6）に 500 μ l のグアニジンチオンアネートバッファー（4 M グアニジンチ
オンアネート、25mM クエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.5% N-ラウロイルサル
5 コシルナトリウム、1%メルカプトエタノール）を加えて溶解させた後、2 回のフ
ェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに 3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）
を添加し攪拌後、2 倍量の冷エタノールを添加してゲノム D N A を得た。この D
N A を用いて、以下のようにして H L A - B 抗原および対立遺伝子の型判定を行
った。

- 10 上記 D N A を用い、5BIN1-TA および 5BIN1-CG と 5'末端をビオチン標識した
3BIN3-37 とをプライマー対として、P C R 法により全ての H L A - B 対立遺伝子
の第 2 エクソン、第 2 イントロンおよび第 3 エクソンを含む領域の増幅を行った。
反応液はゲノム D N A を 100ng、あらかじめ等量の Taq StartTM Antibody と室温で
5 分間反応させた耐熱性 D N A ポリメラーゼを 1.4 unit、そして最終濃度がトリ
15 ス塩酸（pH 8.8）は 67mM、硫酸アンモニウムは 16.6mM、塩化マグネシウムは 1.5mM、
ツイーン 2 0 は 0.01%、DMSO は 10%、dNTPs は 200 μ M、プライマー対は 1.7 μ
M（但し 5BIN1-TA と 5BIN1-CG を 2 : 3 の割合で混合したものを使用した）になる
ように添加した組成液で、全量を 100 μ l として反応を行った。D N A 増幅は
GeneAmp PCR system 9600 の P C R 増幅装置を用い、変性（95°C）を 2 分行った
20 後、変性 25 秒、アニーリング（70°C）45 秒、D N A 伸長（72°C）45 秒の反応を 5
サイクル繰り返し、さらに変性 25 秒、アニーリング（65°C）50 秒、D N A 伸長
（72°C）45 秒の反応を 36 サイクル繰り返すことにより行った。

- 5'末端をアミノ基修飾した D N A プローブ、BL1、BL3、BL4、BL9、BL10、BL11、
BL34、BL36、BL37、BL38、BL39R、BL40、BL41、BL42、BL77、BL78、BL79、BL226G、
25 BL263T、BL272A、BL527A、BL538CG、BL538G、BL570GT をポリスチレン製マイクロ
タイタープレートのカルボキシル基修飾されたウェルに以下の手順で共有結合的

に固相化した。先ず、滅菌蒸留水に溶解した前記DNAプローブを23ウェルで1
検体分とし、図4および図5に示した順番で各ウェルに25 μ lずつ添加し、続い
て0.2M EDC 溶液を75 μ lずつ添加し混和した。次に、シールで蓋をして室温で
16時間放置した後、PBS緩衝液(7.5mMリン酸水素2カリウム、2.5mMリン酸2水
5 素カリウム、0.15M塩化ナトリウム)で4回洗浄した。洗浄後、0.4N NaOHを200
 μ lずつ添加し37°Cで1時間放置した後にPBS緩衝液で4回洗浄した。

マイクロタイタープレートの各ウェルにGMCバッファー(0.25Mりん酸水素2
ナトリウム、7% SDS、1% BSA、0.5M EDTA、0.03Mリン酸、20%ホル
ムアミド)を100 μ lずつ添加して37°Cで5分間放置した後、各ウェルのバッフ
10 ー液を捨てた。またその間に、上記増幅産物96 μ lと等量の0.4N NaOHとを混
和し、室温で5分間静置して変性させた。変性後、それに2400 μ lのハイブリダ
イゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに100 μ lずつ添加した。そ
してマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37°Cで1時間放置した。

ウェルの溶液を除去した後、2 \times SSC洗浄液(0.3M塩化ナトリウム、0.03Mク
15 ェン酸3ナトリウム)で5回洗浄し、各ウェルにTTBS酵素希釈液(0.2Mトリス塩
酸(pH7.6)、0.5M塩化ナトリウム、0.5% ツイーン20)で2000倍に希釈した
ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン(ペーリンガー・マンハイム社製)を100
 μ lずつ添加した。マイクロタイタープレートをシールにより蓋をして37°Cに15
分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で5回洗浄し、発色
20 基質液(TMB 溶液: Kirkegaard & Perry ラボラトリーズ社製)を添加して37°C
で30分間放置した。放置終了後、1% SDSを100 μ lずつ添加して発色反応を停
止させ、650nmの吸光度を測定した。各配列の吸光度から陽性シグナルは1.0以
上の値が、陰性シグナルは0.5未満の値が得られた。また、その結果より、図4
および図5に示した判定表に従って各試料(13~16)についてHLA-B抗
25 原および対立遺伝子の型判定を行った。その結果は下記表4の最下段に示される
通りであった。

【表 4】

H L A - B 抗原および対立遺伝子の型判定結果 (650nm 吸光度)

| ウェル | SSO プローブ | 試料 1 3 | 試料 1 4 | 試料 1 5 | 試料 1 6 |
|------------------------------|----------------|--------|----------|--------|--------|
| 1 | BL36 | 0.064 | 0.131 | 0.101 | 0.087 |
| 2 | BL37 | 2.155 | 0.055 | 0.021 | 0.009 |
| 3 | BL38 | 0.447 | 0.150 | 0.110 | 0.071 |
| 4 | BL39R | 0.147 | 1.476 | 0.143 | 0.103 |
| 5 | BL40 | 0.026 | 0.040 | 0.290 | 0.211 |
| 6 | BL41 | 0.064 | 0.062 | 2.650 | 2.213 |
| 7 | BL42 | 0.268 | 0.235 | 0.237 | 0.120 |
| 8 | BL77 | 2.564 | 0.038 | 0.075 | 0.128 |
| 9 | BL78 | 0.104 | 2.559 | 2.549 | 2.627 |
| 1 0 | BL79 | 0.115 | 0.232 | 0.199 | 2.316 |
| 1 1 | BL1 | 0.080 | 1.065 | 0.176 | 0.241 |
| 1 2 | BL9 | 1.787 | 0.124 | 0.058 | 1.142 |
| 1 3 | BL3 | 0.173 | 0.163 | 0.141 | 0.144 |
| 1 4 | BL4 | 0.055 | 1.720 | 0.142 | 0.215 |
| 1 5 | BL10 | 2.256 | 0.051 | 0.066 | 1.847 |
| 1 6 | BL11 | 0.178 | 0.064 | 0.264 | 0.054 |
| 1 7 | BL272A | 0.038 | 0.105 | 0.044 | 0.071 |
| 1 8 | BL226G | 0.034 | 0.163 | 0.137 | 0.102 |
| 1 9 | BL263TA | 0.005 | 0.173 | 0.048 | 0.012 |
| 2 0 | BL34 | 1.992 | 0.168 | 0.186 | 2.446 |
| 2 1 | BL527A | 2.674 | 0.383 | 2.369 | 1.948 |
| 2 2 | BL538CG+BL538G | 2.619 | 0.311 | 0.354 | 0.356 |
| 2 3 | BL570GT | 2.538 | 0.421 | 2.645 | 2.821 |
| H L A - B 抗原および 対立遺伝子型 | | B7/- | B*4403/- | B51/- | B51/55 |

実施例 5 H L A - C 対立遺伝子の型判定

正常人より採取した血液（約 10ml）より常法に従い分離した白血球（試料 17
～ 20）に 500 μ l のグアニジンチオシアネートバッファー（4 M グアニジンチ
オシアネート、25mM クエン酸ナトリウム（pH 7.0）、0.5% N-ラウロイルサル
5 コシルナトリウム、1%メルカプトエタノール）を加えて溶解させた後、2 回のフ
ェノール抽出によりタンパク質を除去した。これに 3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.2）
を添加し攪拌後、2 倍量の冷エタノールを添加してゲノム DNA を得た。この D
NA を用いて、以下のようにして H L A - C 対立遺伝子の型判定を行った。

上記 DNA を用い、5BCIn37-34C、5BCIn-37-24g および 5BCIn37-34g2 と 5' 末端
10 をビオチン標識した 5BCIn3-12 とをプライマー対として、PCR 法により全ての
H L A - C 対立遺伝子の第 2 エクソン、第 2 イントロンおよび第 3 エクソンを含
む領域の増幅を行った。反応液はゲノム DNA を 100ng、あらかじめ等量の Taq
StartTMAntibody と室温で 5 分間反応させた耐熱性 DNA ポリメラーゼを 1.4 unit、
そして最終濃度がトリス塩酸（pH 8.8）は 67mM、硫酸アンモニウムは 16.6mM、塩
15 化マグネシウムは 2mM、ツイーン 20 は 0.01%、dNTPs は 200 μ M、プライマー対
は 1.7 μ M になるように添加した組成液で、全量を 100 μ l として反応を行った。
DNA 増幅は GeneAmp PCR system 9600 の PCR 増幅装置を用い、変性（95°C）
を 2 分を行った後、変性 25 秒、アニーリング（70°C）45 秒、DNA 伸長（72°C）
45 秒の反応を 5 サイクル繰り返し、さらに変性 25 秒、アニーリング（65°C）50
20 秒、DNA 伸長（72°C）45 秒の反応を 36 サイクル繰り返すことにより行った。

5' 末端をアミノ基修飾した DNA プローブ、201g1、C206gR、A-12、RA-2、A-3、
RA-41、A-54、B-1、RB-28、C-12、C-24、C-33、C-43、134-g、134-A2、353TCA1、
R341A、343A、R343g3、353TCC、361T1、361T368g、361T368T1、369C、387g1、526AC2、
538gAC をポリスチレン製マイクロタイタープレートのカルボキシル基修飾され
25 たウェルに以下の手順で共有結合的に固相化した。先ず、滅菌蒸留水に溶解した
前記 DNA プローブを 23 ウェルで 1 検体分とし、図 6 に示した順番で各ウェルに 25

μl ずつ添加し、続いて 0.2M EDC 溶液を 75 μl ずつ添加し混和した。次に、シールで蓋をして室温で 16 時間放置した後、PBS 緩衝液 (7.5mM リン酸水素 2 カリウム、2.5mM リン酸 2 水素カリウム、0.15M 塩化ナトリウム) で 4 回洗浄した。洗浄後、0.4N NaOH を 200 μl ずつ添加して 37°C で 1 時間放置した後に PBS 緩衝液で 4 回洗浄した。

マイクロタイタープレートの各ウェルに GMC バッファー (0.25M リン酸水素 2 ナトリウム、7% SDS、1% BSA、0.5M EDTA、0.03M リン酸、25%ホルムアミド) を 100 μl ずつ添加して 37°C で 5 分間放置した後、各ウェルのバッファー液を捨てた。またその間に、上記増幅産物 96 μl と等量の 0.4N NaOH とを混和し、室温で 5 分間静置して変性させた。変性後、それに 2400 μl のハイブリダイゼーションバッファーを加えて混和し、各ウェルに 100 μl ずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして 37°C で 1 時間放置した。

ウェルの溶液を除去した後、2×SSC 洗浄液 (0.3M 塩化ナトリウム、0.03M クエン酸 3 ナトリウム) で 5 回洗浄し、各ウェルに TTBS 酵素希釈液 (0.2M トリス塩酸 (pH7.6)、0.5M 塩化ナトリウム、0.5% ツイーン 20) で 2000 倍に希釈したペルオキシターゼ標識ストレプトアビジン (ベーリンガーマンハイム社製) を 100 μl ずつ添加した。そしてマイクロタイタープレートをシールにより蓋をして 37°C に 15 分間放置した。ウェルの溶液を除去した後、前記酵素希釈液で 5 回洗浄し、発色基質液 (TMB 溶液: Kirkegaard & Perry ラボラトリーズ社製) を添加して 37°C で 30 分間放置した。放置終了後、各ウェルに 1% SDS を 100 μl ずつ添加して発色反応を停止させ、650nm の吸光度を測定した。各配列の吸光度から陽性シグナルは 1.0 以上の値が、陰性シグナルは 0.5 未満の値が得られた。また、その結果より、図 6 に示した判定表に従って各試料 (17~20) について HLA-C 対立遺伝子の型判定を行った。その結果は下記表 5 の最下段に示される通りであった。

【表 5】

H L A - C 対立遺伝子の型判定結果 (650nm 吸光度)

| ウェル | SSO プローブ | 試料 1 7 | 試料 1 8 | 試料 1 9 | 試料 2 0 |
|---------------------|------------------------------|----------|----------|----------|-----------------|
| 1 | C206gR | 2.080 | 2.069 | 2.003 | 1.871 |
| 2 | A-12 | 2.165 | -0.024 | -0.029 | 1.805 |
| 3 | RA-2 | 0.020 | 1.992 | 0.120 | 1.979 |
| 4 | A-3 | 0.069 | 0.038 | 0.052 | 0.081 |
| 5 | RA-41 | 0.008 | 0.033 | 0.121 | 0.102 |
| 6 | A-54 | -0.012 | 0.194 | 2.080 | 0.059 |
| 7 | B-1 | 0.202 | 0.124 | 0.145 | 0.233 |
| 8 | RB-28 | 2.403 | 1.640 | 1.716 | 1.998 |
| 9 | C-12 | 1.855 | 0.045 | 0.019 | 1.739 |
| 1 0 | C-24 | 0.138 | 0.064 | 2.002 | 0.287 |
| 1 1 | C-33 | 0.086 | 2.563 | 0.077 | 2.181 |
| 1 2 | C-43 | 0.113 | 0.182 | 0.137 | 0.174 |
| 1 3 | 134-g | 1.594 | 0.089 | 1.763 | 1.384 |
| 1 4 | 134-A2 | 0.049 | 2.096 | 0.291 | 1.380 |
| 1 5 | 343A | 0.021 | 2.672 | 0.047 | 1.480 |
| 1 6 | R343g3+R341A | 2.562 | 0.292 | 2.717 | 1.928 |
| 1 7 | 353TCA1 | 0.001 | 2.551 | 0.157 | 1.740 |
| 1 8 | 353TCC | 0.021 | -0.002 | 0.092 | 0.006 |
| 1 9 | 201g1 | 1.209 | 1.679 | 0.176 | 1.225 |
| 2 0 | 369C | 0.055 | 0.183 | 2.640 | 0.163 |
| 2 1 | 361T1+361T368g +361T368T1 | 2.345 | 0.040 | 0.048 | 1.885 |
| 2 2 | 387g1 | 0.028 | 0.054 | 0.015 | 0.019 |
| 2 3 | 526AC2+538gAC | 0.090 | 0.074 | 0.124 | 0.092 |
| H L A - C 対立遺伝子型 | | C*0102/- | C*0303/- | C*1202/- | C*0102/ 0303 |

産業上の利用可能性

本発明によれば、全てのH L A - A対立遺伝子、全てのH L A - B対立遺伝子または全てのH L A - C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対、あるいは特定のH L A - A対立遺伝子群または特定のH L A - B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対によるP C R増幅と、少なくとも1つの特定のH L A - A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のH L A - B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のH L A - C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能な、マイクロタイター

5 プレートのウェルに共有結合的に固相化したD N Aプローブによるリバーシブルなハイブリダイゼーション解析との組み合わせにより、H L AクラスIの1種類の抗原あるいは対立遺伝子を判別することができるので、従来の血清学的方法によるH L AクラスIローカス抗原タイピングの測定上の問題を解決し、従来法では識別・分類が不可能であったクラスIローカス抗原あるいはそのサブタイプを遺伝子レベルで分類（アレルタイピング）することが可能になる。さらに、従来のH L A

10 クラスI対立遺伝子タイピングにおける操作上や精度上の問題も同時に解決し、簡便かつ迅速に遺伝子タイピングを実施することが可能になる。すなわち本発明により、H L AクラスI対立遺伝子の検出および型判別の機械化および自動化が容易に可能となる。そして本発明はH L AクラスI対立遺伝子型の判別方法、その試薬およびキットを提供するので、これらは臨床医学領域の臓器移植の際のドナー・レシピエント間の適合性の判定や各種疾病との相関性解析などにおいて有用となる。

15 20

請求の範囲

1. 以下の(a)～(d)の工程を含むHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法;
5

(a) HLAクラスI抗原遺伝子またはその断片を含む核酸を鋳型として、

(1) 全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー対を用いてPCR法を行い、全てのHLA-A対立遺伝子、全てのHLA-B対立遺伝子または全てのHLA-C対立遺伝子を非選択的に増幅する工程、または
10

(2) 特定のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群からなる特定のグループ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマー対を用いてPCR法を行い、各特定のグループ内のHLA-A対立遺伝子群または特定のHLA-B対立遺伝子群をグループとして選択的に増幅する工程;

15 (b) 前記PCR法により得られた増幅産物を、少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブをカルボキシル基修飾されたウェルに共有結合的に固相化したマイクロタイタープレートの該ウェルに加え、該増幅産物と固相化したDNAプローブとをハイブリダイズさせる工程(ここで該DNAプローブは前記増幅された特定のHLAクラスI抗原遺伝子または特定のグループに応じて選択されている);
20

(c) 前記増幅産物が固相化したDNAプローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出する工程;

25 (d) 工程(c)で検出されたシグナルのパターンから、判定表に従ってHLAクラスI対立遺伝子型を判別する工程。

2. プライマー対の少なくとも一方が標識されたプライマーであることを特徴とする、請求項1記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法。

3. PCR法により得られた増幅産物を固相化したDNAプローブにハイブリダイズさせると同時またはハイブリダイズさせた後に該増幅産物の標識と特異的に結合する酵素コンジュゲートを加え、さらに該酵素に特異的に反応する発色基質、発光基質または蛍光基質を加えて該増幅産物が固相化したDNAプローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出することを特徴とする、請求項2記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法。

4. プライマー対の少なくとも一方がビオチンで標識されたプライマーであり、さらにPCR法により得られた増幅産物の標識と特異的に結合する酵素コンジュゲートがストレプトアビジン酵素コンジュゲートであることを特徴とする、請求項3記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法。

5. PCR法により得られた増幅産物と固相化したDNAプローブとのハイブリダイゼーション反応がホルムアミドを含む溶液中であることを特徴とする、請求項1から4のいずれかに記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法。

6. PCR法により得られた増幅産物と固相化したDNAプローブとのハイブリダイゼーション反応の温度条件が37℃前後であることを特徴とする、請求項5に記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法。

7. PCR法により得られた増幅産物を固相化したDNAプローブにハイブリダイズさせた後の洗浄および／または該増幅産物の標識と酵素コンジュゲートとの結合反応後の洗浄の温度条件が室温であることを特徴とする、請求項5または6に記載のHLAクラスI対立遺伝子型の判別方法。

8. 少なくとも1つの特定のHLA-A対立遺伝子、少なくとも1つの特定のHLA-B対立遺伝子または少なくとも1つの特定のHLA-C対立遺伝子の塩基配列に特異的にハイブリダイズすることが可能なアミノ基修飾されたDNAプローブが、A98T(配列番号1)、A98A(配列番号2)、A160A(配列番号3)、A239A

- (配列番号 4)、A238A (配列番号 5)、A240T (配列番号 6)、A257TC (配列番号 7)、A259AC (配列番号 8)、A270T (配列番号 9)、A282C (配列番号 10)、A290T (配列番号 11)、A299T (配列番号 12)、A302G (配列番号 13)、A355G (配列番号 14)、A362TA (配列番号 15)、A362TT (配列番号 16)、A368A (配列番号 17)、A368G (配列番号 18)、A368T (配列番号 19)、A402G (配列番号 20)、A423T (配列番号 21)、A448C (配列番号 22)、A485A (配列番号 23)、A524G (配列番号 24)、A526T (配列番号 25)、A527A (配列番号 26)、A538CG (配列番号 27)、A539A (配列番号 28)、A539T (配列番号 29)、A555T (配列番号 30)、A559G (配列番号 31)、A570CG (配列番号 32)、A570GT (配列番号 33)、A779A (配列番号 34)、A843A (配列番号 35)、BL1 (配列番号 36)、BL3 (配列番号 37)、BL4 (配列番号 38)、BL5 (配列番号 39)、BL9 (配列番号 40)、BL10 (配列番号 41)、BL11 (配列番号 42)、BL24 (配列番号 43)、BL25 (配列番号 44)、BL34 (配列番号 45)、BL35 (配列番号 46)、BL36 (配列番号 47)、BL37 (配列番号 48)、BL38 (配列番号 49)、BL39 (配列番号 50)、BL40 (配列番号 51)、BL41 (配列番号 52)、BL42 (配列番号 53)、BL56 (配列番号 54)、BL57 (配列番号 55)、BL78 (配列番号 56)、BL79 (配列番号 57)、BL222A (配列番号 58)、BL272GA (配列番号 59)、BL226G (配列番号 60)、BL292G (配列番号 61)、BL292T (配列番号 62)、BL361G (配列番号 63)、BL409T (配列番号 64)、BL512T (配列番号 65)、BL538CG (配列番号 66)、BL538G (配列番号 67)、CC (配列番号 68)、A-12 (配列番号 69)、A-2 (配列番号 70)、A-3 (配列番号 71)、A-4 (配列番号 72)、A-54 (配列番号 73)、B-1 (配列番号 74)、B-2 (配列番号 75)、C-12 (配列番号 76)、C-24 (配列番号 77)、C-33 (配列番号 78)、C-43 (配列番号 79)、134-g (配列番号 80)、134-A2 (配列番号 81)、353TCA1 (配列番号 82)、343A (配列番号 83)、A34 (配列番号 100)、A282CT (配列番号 101)、A290TR (配列番号 102)、A302GR (配列番号 103)、A414A (配

列番号 1 0 4)、A468T(配列番号 1 0 5)、A489A(配列番号 1 0 6)、A502C
(配列番号 1 0 7)、A538TG(配列番号 1 0 8)、BL39R(配列番号 1 0 9)、BL50
(配列番号 1 1 0)、BL77(配列番号 1 1 1)、BL272A(配列番号 1 1 2)、BL263T
(配列番号 1 1 3)、BL527A(配列番号 1 1 4)、BL570GT(配列番号 1 1 5)、
5 RA-2(配列番号 1 1 6)、RA-41(配列番号 1 1 7)、RB-28(配列番号 1 1 8)、
201g1(配列番号 1 1 9)、C206gR(配列番号 1 2 0)、R341A(配列番号 1 2 1)、
R343g3(配列番号 1 2 2)、353TCC(配列番号 1 2 3)、361T1(配列番号 1 2 4)、
361T368g(配列番号 1 2 5)、361T368T1(配列番号 1 2 6)、369C(配列番号 1
2 7)、387g1(配列番号 1 2 8)、526AC2(配列番号 1 2 9)、538gAC(配列番
10 号 1 3 0) およびそれらの相補鎖、並びにそれらの末端配列に対し数塩基が欠失
または付加した核酸から選ばれるものである、請求項 1 から 7 のいずれかに記載
の H L A クラス I 対立遺伝子型の判別方法。

9. 全ての H L A - A 対立遺伝子、全ての H L A - B 対立遺伝子または全ての
H L A - C 対立遺伝子を増幅することが可能なプライマー、あるいは特定の H L
15 A - A 対立遺伝子群または特定の H L A - B 対立遺伝子群からなる特定のグルー
プ内の各遺伝子に共通の塩基配列に特異的なプライマーが、A2-5T(配列番号 8 4)、
A3-273T(配列番号 8 5)、A4-8C(配列番号 8 6)、A4-254G(配列番号 8 7)、
BASF-1(配列番号 8 8)、BASR-1(配列番号 8 9)、CGA011(配列番号 9 0)、
CGA012(配列番号 9 1)、AIn3-66C(配列番号 9 2)、5BCIn37-34C(配列番号 9
20 6)、5BCIn37-24g(配列番号 9 7) および 5BCIn37-34g2(配列番号 9 9) から選
ばれるものである、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の H L A クラス I 対立遺伝
子型の判別方法。

10. A98T(配列番号 1)、A98A(配列番号 2)、A160A(配列番号 3)、A239A
(配列番号 4)、A238A(配列番号 5)、A240T(配列番号 6)、A257TC(配列番
25 号 7)、A259AC(配列番号 8)、A270T(配列番号 9)、A282C(配列番号 1 0)、
A290T(配列番号 1 1)、A299T(配列番号 1 2)、A302G(配列番号 1 3)、A355G

(配列番号 1 4)、A362TA (配列番号 1 5)、A362TT (配列番号 1 6)、A368A
(配列番号 1 7)、A368G (配列番号 1 8)、A368T (配列番号 1 9)、A402G (配
列番号 2 0)、A423T (配列番号 2 1)、A448C (配列番号 2 2)、A485A (配列番
号 2 3)、A524G (配列番号 2 4)、A526T (配列番号 2 5)、A527A (配列番号 2
5 6)、A538CG (配列番号 2 7)、A539A (配列番号 2 8)、A539T (配列番号 2 9)、
A555T (配列番号 3 0)、A559G (配列番号 3 1)、A570CG (配列番号 3 2)、A570GT
(配列番号 3 3)、A779A (配列番号 3 4)、A843A (配列番号 3 5)、BL1 (配列
番号 3 6)、BL3 (配列番号 3 7)、BL4 (配列番号 3 8)、BL5 (配列番号 3 9)、
BL9 (配列番号 4 0)、BL10 (配列番号 4 1)、BL11 (配列番号 4 2)、BL24 (配
10 列番号 4 3)、BL25 (配列番号 4 4)、BL34 (配列番号 4 5)、BL35 (配列番号
4 6)、BL36 (配列番号 4 7)、BL37 (配列番号 4 8)、BL38 (配列番号 4 9)、
BL39 (配列番号 5 0)、BL40 (配列番号 5 1)、BL41 (配列番号 5 2)、BL42 (配
列番号 5 3)、BL56 (配列番号 5 4)、BL57 (配列番号 5 5)、BL78 (配列番号
5 6)、BL79 (配列番号 5 7)、BL222A (配列番号 5 8)、BL272GA (配列番号 5
15 9)、BL226G (配列番号 6 0)、BL292G (配列番号 6 1)、BL292T (配列番号 6
2)、BL361G (配列番号 6 3)、BL409T (配列番号 6 4)、BL512T (配列番号 6
5)、BL538CG (配列番号 6 6)、BL538G (配列番号 6 7)、CC (配列番号 6 8)、
A-12 (配列番号 6 9)、A-2 (配列番号 7 0)、A-3 (配列番号 7 1)、A-4 (配列
番号 7 2)、A-54 (配列番号 7 3)、B-1 (配列番号 7 4)、B-2 (配列番号 7 5)、
20 C-12 (配列番号 7 6)、C-24 (配列番号 7 7)、C-33 (配列番号 7 8)、C-43 (配
列番号 7 9)、134-g (配列番号 8 0)、134-A2 (配列番号 8 1)、353TCA1 (配
列番号 8 2)、343A (配列番号 8 3)、A34 (配列番号 1 0 0)、A282CT (配列番
号 1 0 1)、A290TR (配列番号 1 0 2)、A302GR (配列番号 1 0 3)、A414A (配
列番号 1 0 4)、A468T (配列番号 1 0 5)、A489A (配列番号 1 0 6)、A502C
25 (配列番号 1 0 7)、A538TG (配列番号 1 0 8)、BL39R (配列番号 1 0 9)、BL50
(配列番号 1 1 0)、BL77 (配列番号 1 1 1)、BL272A (配列番号 1 1 2)、BL263T

- (配列番号 1 1 3)、BL527A (配列番号 1 1 4)、BL570GT (配列番号 1 1 5)、RA-2 (配列番号 1 1 6)、RA-41 (配列番号 1 1 7)、RB-28 (配列番号 1 1 8)、201g1 (配列番号 1 1 9)、C206gR (配列番号 1 2 0)、R341A (配列番号 1 2 1)、R343g3 (配列番号 1 2 2)、353TCC (配列番号 1 2 3)、361T1 (配列番号 1 2 4)、
- 5 361T368g (配列番号 1 2 5)、361T368T1 (配列番号 1 2 6)、369C (配列番号 1 2 7)、387g1 (配列番号 1 2 8)、526AC2 (配列番号 1 2 9)、538gAC (配列番号 1 3 0) およびそれらの相補鎖、並びにそれらの末端配列に対し数塩基が欠失または付加した核酸から選ばれる、H L A クラス I 対立遺伝子型の判別方法に使用するための D N A プローブ。
- 10 1 1. BASF-1 (配列番号 8 8)、BASR-1 (配列番号 8 9)、CGA011 (配列番号 9 0)、CGA012 (配列番号 9 1)、AIn3-66C (配列番号 9 2)、5BCIn37-34C (配列番号 9 6)、5BCIn37-24g (配列番号 9 7) および 5BCIn37-34g2 (配列番号 9 9) から選ばれる、H L A クラス I 対立遺伝子判別法に使用するためのプライマー。
- 1 2. 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法に使用するための、H L A クラ
- 15 ス I 対立遺伝子型の判別のためのキット。
- 1 3. 請求項 1 から 9 のいずれかに記載の方法に使用するための、H L A クラ
- ス I 対立遺伝子型の判別のため試薬。
- 1 4. 請求項 1 0 記載の D N A プローブを含む、H L A クラス I 対立遺伝子型
- の判別のためのキット。
- 20 1 5. 請求項 1 0 記載の D N A プローブを含む、H L A クラス I 対立遺伝子型
- の判別のための試薬。
- 1 6. 請求項 1 1 記載のプライマーを含む、H L A クラス I 対立遺伝子型の判
- 別のためのキット。
- 1 7. 請求項 1 1 記載のプライマーを含む、H L A クラス I 対立遺伝子型の判
- 25 別のための試薬。

[2000年2月28日(28.02.00)国際事務局受理:新しい請求の
範囲18-25が加えられた;他の請求の範囲は変更なし。(1頁)]

18. (追加) 10~25% ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液中、32℃~42℃の温度条件で、14~24塩基以上のプローブを用いて、ハイブリダイゼーションを行なうことを特徴とする、特定の塩基配列の有無の検出方法。

5 19. (追加) 0.25M リン酸水素二ナトリウム、7% ドデシル硫酸ナトリウム、1% 牛血清アルブミン、0.03M リン酸、0.5M エチレンジアミン四酢酸及び10~25% ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液を使用することを特徴とする、請求項18に記載の検出方法。

20. (追加) ハイブリダイゼーション後の洗浄条件が室温であることを特徴とする、請求項18または19に記載の検出方法。
10

21. (追加) PCR法により得られた増幅産物を対象としてプローブへのハイブリダイゼーションを行なうことを特徴とする、請求項18から20のいずれかに記載の検出方法。

22. (追加) プライマー対の少なくとも一方が標識されたプライマーであることを特徴とする、請求項21に記載の検出方法。
15

23. (追加) 担体に固相化したプローブに核酸をハイブリダイズすることを特徴とする、請求項18から22のいずれかに記載の検出方法。

24. (追加) PCR法により得られた増幅産物を固相化したプローブにハイブリダイズさせると同時またはハイブリダイズさせた後に該増幅産物の標識と特異的に結合する酵素コンジュゲートを加え、さらに該酵素に特異的に反応する発色基質、発光基質または蛍光基質を加えて該増幅産物が固相化したプローブにハイブリダイズしているか否かをシグナルとして検出することを特徴とする、請求項21から23のいずれかに記載の検出方法。
20

25. (追加) 標識がビオチンであり、酵素コンジュゲートがストレプトアビジン酵素コンジュゲートである請求項24に記載の検出方法。
25

図 1

HLA-A2 (高解像度)

| ウェル番号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
|--------------|----------|-------|-------|-------|---------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|
| HLA-A 対立遺伝子型 | SSO プローブ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | A240T | A368A | A368G | A368T | A362TT+A362TA | A98T | A98A | A539T | A539A | A402G | A527A | A270T | A290T | A559G | A485A | A355G | A160A | A570CG | A779A | A843A |
| A*0220 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | ■ | | | | ■ | | | | |
| A*0211 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | ■ | | | ■ | | | | |
| A*0216 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | ■ | | | ■ | | | | |
| A*0209 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | | ■ | | ■ | | | ■ | |
| A*0201 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | | ■ | |
| A*0213 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | ■ | | | | | ■ | | | | |
| A*0219 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | ■ | | |
| A*0212 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | | | |
| A*0202 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | ■ | | | | | | ■ | | | | |
| A*0203 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | ■ | | | | | ■ | | | | |
| A*0214 | ■ | ■ | | | | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | | | | ■ | | | | |
| A*0221 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | ■ | | | |
| A*0206 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | | | |
| A*0208 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | ■ | | | | ■ | | | | |
| A*0205 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | | | |
| A*0218 | ■ | ■ | ■ | | | ■ | | ■ | | | | | | | ■ | ■ | | | | |
| A*0215N | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | | | ■ |
| A*0207 | ■ | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | | | |
| A*0210 | ■ | ■ | | ■ | | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | | | |
| A*0204 | ■ | ■ | | | ■ | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | | | |
| A*0217 | ■ | ■ | | | ■ | ■ | | ■ | | | | | | | | ■ | | | | |

■ : 陽性反応
□ : 陰性反応



図2

HLA-B40 (高解像度)

| ウェル番号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|------------------|----------|------|------|-----|-----|------|------|--------|------|------|------|------|------|------|--------|
| HLA-B 対立 遺伝子型 | SSO プローブ | | | | | | | | | | | | | | |
| | BL222A | BL34 | BL35 | BL4 | BL5 | BL24 | BL25 | BL512T | BL37 | BL39 | BL41 | BL50 | BL56 | BL57 | BL409T |
| B*4001 | ■ | ■ | | ■ | | ■ | | ■ | | | | | ■ | | |
| B*4002 | ■ | | | ■ | | ■ | | | ■ | | | | ■ | | |
| B*4003 | ■ | | | | | | | | | | | | | ■ | |
| B*4009 | ■ | | | | | | | | | | | | | | ■ |
| B*4004 | ■ | | | | | | | | | ■ | | | ■ | | |
| B*4006 | ■ | | | | | | | | | | ■ | | ■ | | |
| B*4702 | ■ | | | | | | | | | | | ■ | | | |
| B*4007 | ■ | | | | ■ | | | ■ | | | | | ■ | | |
| B*4008 | ■ | | | | ■ | | ■ | | ■ | | | | | | |
| B*4701 | ■ | ■ | ■ | | | ■ | | | | | | ■ | | | |

■ : 陽性反応

□ : 陰性反応



図 3

HLA-A (中解像度)

| ウェル番号 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|-------------|------------------------------|----------|--------|--------|--------------|-------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|-----|-------|-------|-------|-------|
| HLA-A 抗原 | HLA-A 対立遺伝子型 | SSO プローブ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | A468T | A570CG | A570GT | A282C+A282CT | A299T | A290TR | A355G | A259AC | A257TC | A238A | A239A | A538CG | A555T | A539T | A539A | A526T | A538TG | A302GR | A34 | A414A | A448C | A489A | A502C |
| A80 | A*8001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A1 | A*0101/02 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A23 | A*2301 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A24 | A*2404 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A24 | A*2405 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A24 | A*2402 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A24 | A*2406 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A24 | A*2407 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A74 | A*7401 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A2 | A*0211 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A33 | A*3301/03 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A31 | A*31012 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A2 | A*0201/04/06/07/09/10/15N/16 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A2 | A*0212/13 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A2 | A*0203 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A25 | A*2501 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A26 | A*2601/02/03/04/05 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A43 | A*4301 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A30 | A*3002 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A30 | A*3004 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A36 | A*3601 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A32 | A*3201 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A30 | A*3003 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A2 | A*0214/17 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A24 | A*2403 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A2 | A*0202/05/08 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A34/66 | A*3401/6601/02 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A68 | A*68011/012/02 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A34 | A*3402 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A69 | A*6901 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A30 | A*3001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A3 | A*0301 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A3 | A*0302 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A11 | A*1101/02 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| A29 | A*2901/02 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

■ : 陽性反応
□ : 陰性反応



図4

HLA-B (中解像度)

| ウェル番号 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|-------------|------------------|----------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------|-----|------|------|-------|--------|--------|------|--------|----------------|---------|
| HLA-B 抗原 | HLA-B 対立遺伝子型 | SSO プローブ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | BL36 | BL37 | BL38 | BL39R | BL40 | BL41 | BL42 | BL77 | BL78 | BL79 | BL1 | BL9 | BL13 | BL4 | BL10 | BL11 | BL27A | BL226G | BL263T | BL34 | BL527A | BL538CG+BL538G | BL570GT |
| B27 | B*2708 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B27 | B*2706 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B27 | B*2702/03/04/05 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B18 | B*1802 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B61 | B*4002/03 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B48 | B*4801 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B7 | B*0702/04/05 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B81 | B*8101 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B7 | B*0703 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B27 | B*2707 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B4005 | B*4005 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B62 | B*1507 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B35 | B*3505 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B41 | B*4102 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B42 | B*4201 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B8 | B*0801 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B39 | B*3903 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B8 | B*0802 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B60 | B*4001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B47 | B*4701 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B60 | B*4007 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B70 | B*1503 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B8201 | B*8201 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B56 | B*5602 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B70 | B*1509/10/18/29 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B15 | B*1523 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B63 | B*1517 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B75 | B*1528 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B62 | B*1501/06/15/26N | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B76 | B*1512/14/19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B62 | B*1505 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B62 | B*1524 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B46 | B*4601 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B75 | B*1511 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B62 | B*1508/22 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B39 | B*3902/08 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B67 | B*6701 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B39 | B*3901/04/05/07 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B38 | B*3801/02 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B18 | B*1801 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

■ : 陽性反応

□ : 陰性反応



図5

| ウェル番号 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|-------------|-----------------------------------|----------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|------|------|--------|--------|--------|------|--------|----------------|---------|
| HLA-B 抗原 | HLA-B 対立遺伝子型 | SSO プローブ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | BL36 | BL37 | BL38 | BL39R | BL40 | BL41 | BL42 | BL77 | BL78 | BL79 | BL1 | BL9 | BL3 | BL4 | BL10 | BL11 | BL272A | BL226G | BL263T | BL34 | BL527A | BL538CG+BL538G | BL570GT |
| B61 | B*4004 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B13 | B*1301 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B44 | B*4402/05 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B44 | B*4403 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B48 | B*4802 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B17 | B*5702 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B17 | B*5701/03/5801/03 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B62,75 | B*1502/25 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B62 | B*1520 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B77 | B*1513 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B35,75 | B*1521/3511 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B35 | B*3508 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B35 | B*3501/02/03/04/06/07/09/10/12/13 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B51 | B*5104 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B44 | B*4406 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B53 | B*5301 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B44 | B*4404 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B50 | B*5001 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B45 | B*4501 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B49 | B*4901 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B63 | B*1516 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B41 | B*4101 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B61 | B*4006 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B73 | B*7301 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B13 | B*1302 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B56 | B*5601 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B62 | B*1504 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B52 | B*5201 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B13 | B*1303 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B78 | B*7801/02 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B51 | B*5101/02 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B51 | B*5103 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B51 | B*5105 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B55 | B*5501 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B55 | B*5502 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B39 | B*3906 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B59 | B*5901 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B54 | B*5401 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B17 | B*5802 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B14 | B*1401/02 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| B37 | B*3701 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

■ : 陽性反応

□ : 陰性反応



図6

HLA-C (中 / 高解像度)

| ウェル番号 | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|-------------|------------------------|----------|------|------|-----|-------|------|-----|-------|------|------|------|------|------|-------|------|--------------|---------|--------|-------|------|---------------------------|-------|---------------|
| HLA-C 抗原 | HLA-C 対立遺伝子型 | SSO プローブ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | C206gR | A-12 | RA-2 | A-3 | RA-41 | A-54 | B-1 | RB-28 | C-12 | C-24 | C-33 | C-43 | I34g | I34A2 | 343A | R343g3+R341A | 353TCA1 | 353TCC | 201g1 | 369C | 381T+381T38g +381T38T1 | 387g1 | 526AC2+538gAC |
| Cw1 | Cw*0102/03 | ■ | ■ | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | ■ | | | | | | | |
| Cw2 | Cw*02021/022/ 024 | | ■ | ■ | | | | ■ | | | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | | ■ | | |
| Cw2 | Cw*02023 | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | |
| - | Cw*0403 | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | ■ |
| - | Cw*15 | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | ■ | | | | | | |
| Cw10(w3) | Cw*0302 | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | ■ | ■ | | | | |
| Cw9(w3) | Cw*0303 | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | |
| Cw10(w3) | Cw*0304 | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cw4 | Cw*0401 | | | ■ | | | | ■ | | ■ | | | | ■ | | | | | | | | | | ■ |
| Cw4 | Cw*0402 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| - | Cw*0404 | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | |
| - | Cw*1402 | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | ■ | | | ■ | |
| - | Cw*1403 | | | ■ | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | |
| - | Cw*1801/02 | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | ■ |
| Cw6 | Cw*0602 | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | ■ | | |
| - | Cw*0707 | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | |
| (Cw7) | Cw*0701/02/03/05/06/08 | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cw7 | Cw*0704 | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ |
| Cw5 | Cw*0501 | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| - | Cw*12041 | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | ■ | | | |
| - | Cw*12042/05 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| - | Cw*1701/02 | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | |
| - | Cw*1602 | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | |
| Cw8 | Cw*0802 | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| - | Cw*1202 | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | ■ | | |
| - | Cw*1203/1604 | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | |
| - | Cw*1301 | | | | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | |
| Cw8 | Cw*0801/03 | | | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | ■ |
| - | Cw*1601 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

■ : 陽性反応

□ : 陰性反応



SEQUENCE LISTING

<110> Shionogi & Co.,LTD.

<120> Method for typing HLA class 1 genes

<130> G006737

<140>

<141>

<150> JP P1998-335151

<151> 1998-11-26

<160> 130

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A98T

<400> 1

gaggatatttc ttcacatccg tgt

23

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A98A

<400> 2

atgagggtatt tctacacctc cgtgt

25

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A160A



<400> 3

tacgtggaca acacgcagt

19

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A239A

<400> 4

caggaggagc cggag

15

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A238A

<400> 5

caggagaggc ctgag

15

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A240T

<400> 6

caggagggtc cggagtat

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A257TC

<400> 7

ttgggacctg cagacacg

18



<210> 8
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A259AC

<400> 8
gggaccggaa cacacgg

17

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A270T

<400> 9
gacacggaat gtgaaggc

18

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A282C

<400> 10
tgaaggccca ctcacagact

20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A290T

<400> 11
actcacagat tgaccgagtg

20

<210> 12
<211> 17
<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A299T

<400> 12

agactgaccg agtggac

17

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A302G

<400> 13

ccgagagagc ctgcgga

17

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A355G

<400> 14

tctcacaccg tccagagg

18

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A362TA

<400> 15

ccgtccagat gatgtatgg

19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A362TT

<400> 16
ccctccagat gatgtttgg

19

<210> 17
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A368A

<400> 17
gaggatgtat ggctgc

16

<210> 18
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A368G

<400> 18
gaggatgtgt ggctgc

16

<210> 19
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A368T

<400> 19
gaggatgttt ggctgc

16

<210> 20
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A402G

<400> 20



cgcttcctgc gcgggt

16

<210> 21

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A423T

<400> 21

caggacgctt acgacgg

17

<210> 22

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A448C

<400> 22

catcgccctg aacgag

16

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A485A

<400> 23

gcggacaagg cagctc

16

<210> 24

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A524G

<400> 24

gcggcccgtg tggcgg

16

<210> 25

<211> 17



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A526T

<400> 25

cggcccgttg ggcggag

17

<210> 26

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A527A

<400> 26

gcccatgagg cggag

15

<210> 27

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A538CG

<400> 27

gagcagcgga gagtc

15

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A539A

<400> 28

gagcagcaga gagcct

16

<210> 29

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A539T

<400> 29

gagcagttga gagcc

15

<210> 30

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A555T

<400> 30

tacctggatg gcacgt

16

<210> 31

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A559G

<400> 31

tggagggcga gtgcgt

16

<210> 32

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A570CG

<400> 32

gcgtggacgg gctccg

16

<210> 33

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A570GT



<400> 33
gcgtggagtg gctcc 15

<210> 34
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A779A

<400> 34
caggcctgaa ggggatg 17

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A843A

<400> 35
agcagagata aacctgccat 20

<210> 36
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL1

<400> 36
tccgaggaag gagccgc 17

<210> 37
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL3

<400> 37
acacggaaca tgaaggcc 18



<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL4

<400> 38
acacagatct ccaagacc

18

<210> 39
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL5

<400> 39
cacagatctt caagaccaa

19

<210> 40
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL9

<400> 40
gtccgagaga ggagccgc

18

<210> 41
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL10

<400> 41
gatctacaag gccaggc

18

<210> 42
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL11

<400> 42

gaagtacaag cgccaggc

18

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL24

<400> 43

ggaccgggag acacagat

18

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL25

<400> 44

gaccggaaca cacagatc

18

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL34

<400> 45

gcgcggctac tacaacca

18

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL35



<400> 46

gctccgctac tacaaccag

19

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL36

<400> 47

ccctccagaa tatgtatggc

20

<210> 48

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL37

<400> 48

ctccagagca tgtacggct

19

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL38

<400> 49

acaccctcca gaggatgtac

20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL39

<400> 50

cgggtctcac atcatccaga

20

<210> 51



<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL40

<400> 51

tcacacttgg cagaggat

18

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL41

<400> 52

tcacacttgg cagacgat

18

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL42

<400> 53

acaccctcca gtggatgtat g

21

<210> 54

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL56

<400> 54

gcgggcataa ccagtacg

18

<210> 55

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL57

<400> 55

atgaccagtc cgcctacga

19

<210> 56

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL78

<400> 56

tggagggcct gtgcgtg

17

<210> 57

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL79

<400> 57

tggagggcac gtgcgtg

17

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL222A

<400> 58

cgggcgccat ggatagag

18

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL272GA



<400> 59

acagatctgc aagaccaa

18

<210> 60

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL226G

<400> 60

ccgtgggtgg agcagga

17

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL292G

<400> 61

gcacagactg accgagag

18

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL292T

<400> 62

cacagactta ccgagaga

18

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL361G



<400> 63
atcatccagg tgatgtatgg

20

<210> 64
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL409T

<400> 64
ccgcgggtat gaccagt

17

<210> 65
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL512T

<400> 65
cgcaagttgg aggcg

15

<210> 66
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL538CG

<400> 66
gagcagcgga gagcc

15

<210> 67
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL538G



<400> 67

ggagcaggac agagcct

17

<210> 68

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe CC

<400> 68

tgggtggagc aggagg

16

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A-12

<400> 69

catgaagtat ttcttcacat ccgt

24

<210> 70

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A-2

<400> 70

ctacaccgcc tgtgtcccg

19

<210> 71

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A-3

<400> 71

atgaggtatt tctccacatc cg

22



<210> 72
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A-4

<400> 72
tgaggtattt cgacaccgc

19

<210> 73
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A-54

<400> 73
gtatttctac accgccgtgt c

21

<210> 74
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe B-1

<400> 74
ccgagtgaac ctgcggaa

18

<210> 75
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe B-2

<400> 75
ccgagtgagc ctgcggaa

18

<210> 76
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe C-12

<400> 76

gagcagcgga gagcc

15

<210> 77

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe C-24

<400> 77

gagcagtgga gagc

14

<210> 78

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe C-33

<400> 78

gagcagctga gagcc

15

<210> 79

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe C-43

<400> 79

gagcagcaga gagcc

15

<210> 80

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe 134-g



<400> 80
grgagccccg cttcatcg

18

<210> 81
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
134-A2

<400> 81
grgagcccca cttcatcgc

19

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
353TCA1

<400> 82
ggtctcacat catccagagg

20

<210> 83
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe 343A

<400> 83
cgaggccagt gagtga

16

<210> 84
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
A2-5T

<400> 84



ctcctcgtcc ccaggctct

19

<210> 85

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
A3-273T

<400> 85

gtggcccctg gtaccctg

18

<210> 86

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
A4-8C

<400> 86

tccygcwaga cscctccc

17

<210> 87

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
A4-254G

<400> 87

ctcagggtga ggggcttg

18

<210> 88

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
BASF-1

<400> 88



ccgcgagtcc gagga

16

<210> 89

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
BASR-1

<400> 89

gccactccac gcactc

16

<210> 90

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
CGA011

<400> 90

ccgaaccctc ctcttgcta

19

<210> 91

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
CGA012

<400> 91

ccgaaccctc gtcttgcta

19

<210> 92

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
AIn3-66C

<400> 92



tggttggtccc aattgtctcc cctc

24

<210> 93

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
5BIN1-TA

<400> 93

ggcggggggcg caggacctga

20

<210> 94

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
5BIN1-CG

<400> 94

cggggggcgca ggacccgg

18

<210> 95

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
3BIN3-37

<400> 95

aggccatccc cgscgacctt t

21

<210> 96

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
5BCIn37-34C

<400> 96



gaggggaaacg gcctctgcgg a

21

<210> 97

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
5BCIn37-24g

<400> 97

gaggggaagcg gcctctgcgg a

21

<210> 98

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
3BCIn3-12

<400> 98

ggagatgggg aaggctcccc act

23

<210> 99

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
5BCIn37-34g2

<400> 99

tgggaggggaa acggcctctg g

21

<210> 100

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A34

<400> 100

gcgcggctac tacaacca

18



<210> 101
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A282CT

<400> 101
tgaaggccca ctcacagatt

20

<210> 102
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A290TR

<400> 102
actcgggtcaa tctgtgagtg

20

<210> 103
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A302GR

<400> 103
tccgcaggct ctctcgg

17

<210> 104
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A414A

<400> 104
cgggtatgaa cagcacgc

18



<210> 105

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A468T

<400> 105

ctgcgctctt ggaccg

16

<210> 106

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A489A

<400> 106

gacatggcag ctcaga

16

<210> 107

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe A502C

<400> 107

atcaccgcagc gcaa

14

<210> 108

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
A538TG

<400> 108

ggagcagtgg agagc

15

<210> 109

<211> 21

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL39R

<400> 109

ctctggatga tgtgagaccc t

21

<210> 110

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL50

<400> 110

gaggatgttt ggctgcg

17

<210> 111

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe BL77

<400> 111

tggagggcga gtgcgt

16

<210> 112

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL272A

<400> 112

acagatctac aagaccaa

18

<210> 113

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>



<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL263T

<400> 113

ccgggagata cagatctc

18

<210> 114

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL527A

<400> 114

gcccgtgagg cggag

15

<210> 115

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
BL570GT

<400> 115

gcgtggagtg gctcc

15

<210> 116

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe RA-2

<400> 116

cgggacacag cggtgtag

18

<210> 117

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe RA-41



<400> 117
gcggtgtcga aatacct

17

<210> 118
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe RB-28

<400> 118
caggctcact cggtcagc

18

<210> 119
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe 201g1

<400> 119
cgcgagtccg agagggga

18

<210> 120
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
C206gR

<400> 120
gagtcacraga ggggagcc

18

<210> 121
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe R341A

<400> 121
actcaccgctc ctcgctct

18



<210> 122

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
R343g3

<400> 122

tcactcaccg gcctcgct

18

<210> 123

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
353TCC

<400> 123

gtctcacatc ctccagag

18

<210> 124

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe 361T1

<400> 124

caccctccag tggatgtatg

20

<210> 125

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
361T368g

<400> 125

caccctccag tggatgtgtg

20



<210> 126

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
361T368T1

<400> 126

accctccagt ggatgtttg

19

<210> 127

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe 369C

<400> 127

ggatgtacgg ctgcga

16

<210> 128

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe 387g1

<400> 128

ctggggcccg acgggcg

17

<210> 129

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
526AC2

<400> 129

ggcccgtagc gcgga

15

<210> 130

<211> 16



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:DNA probe
538gAC

<400> 130

ggagcaggac agagcc



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. —

PCT/JP99/05527

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12Q 1/68, C12N 15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q 1/68, C12N 15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), MEDLINE (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | WO, 98/26091, A2 (Visible Genetics, Inc.), 18 June, 1998 (18.06.98) & AU, 9853964, A | 10-11, 14-17 |
| Y | M, Sakauchi, et al., "HLA and Disease-2.; Progress in HLA Examination Method (in Japanese)", Nichijo shinryo to ketsueki (1995) Vol.5, No.10, p.1269-1274 | 10-11, 14-17 |
| Y | Marta Janer et al., "The human major histocompatibility complex: 42,221 bp of genomic sequence, high-density sequence-tagged site map, evolution, and polymorphism for HLA class I", Genomics (1998) Vol.51, No.1, p.35-44 | 10-11, 14-17 |
| PX | MORIBE Toyoki et al., "Rapid HLA class I DNA typing using microtiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) by simple thermoregulation: high-resolution subtyping of the HLA-A2 and-B40 antigen groups", Human Immunology (June.1999) Vol.60, p.539-549 | 1-17 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 January, 2000 (07.01.00)

Date of mailing of the international search report
11 January, 2000 (11.01.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C12Q 1/68, C12N 15/11

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C12Q 1/68, C12N 15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル (JOIS), MEDLINE (STN),
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | WO, 98/26091, A2 (Visible Genetics, Inc.) 18.6月. 1998 (18.06.98) &AU, 9853964, A | 10-11, 14-17 |
| Y | 坂内 誠 他 “HLAと疾患-2. HLA検査法の進歩”, 日常診療と血液 (1995) Vol. 5, No. 10, p. 1269-1274 | 10-11, 14-17 |
| Y | Marta Janer et al., “The human major histocompatibility complex: 42, 221 bp of genomic sequence, high-density sequence- tagged site map, evolution, and polymorphism for HLA class I”, Genomics (1998) Vol. 51, No. 1, p. 35-44 | 10-11, 14-17 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 01. 00

国際調査報告の発送日

11.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| P X | MORIBE Toyoki et al., "Rapid HLA class I DNA typing using microtiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) by simple thermoregulation:high-resolution subtyping of the HLA-A2 and-B40 antigen groups", Human Immunology (June.1999) Vol.60, p. 539-549 | 1 - 17 |